

VU Research Portal

Evaluatie CTT Biotests: signalering, vangnetfunctie en diskwalificatie

van Hattum, A.G.M.; Kruseman, G.

2005

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

van Hattum, A. G. M., & Kruseman, G. (2005). *Evaluatie CTT Biotests: signalering, vangnetfunctie en diskwalificatie*. (IVM Report; No. E-05/07). Instituut voor Milieuvraagstukken.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Evaluatie CTT Biotests: signalering, vangnetfunctie en diskwalificatie

B. van Hattum en G. Kruseman

E-05/07

December, 2005

De onderhavige studie is uitgevoerd in opdracht van het Rijksinstituut voor Kust en Zee (RIKZ) in het kader van het Project Beleidsagenda Zoute Bagger (opdracht nr. 67050939 d.d. 14-9-2005). Het project werd vanuit het RIKZ begeleid door Louis Peperzak (deelprojectleider), Cor Schipper (projectleider) en Hans Klamer.

Interne review: Timo Hamers

IVM

Instituut voor Milieuvraagstukken
Vrije Universiteit
De Boelelaan 1087
1081 HV Amsterdam

Tel. 020-5989 555

Fax. 020-5989 553

E-mail: info@ivm.falw.vu.nl

Copyright © 2005, Instituut voor Milieuvraagstukken, RIKZ

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de houder van het auteursrecht.

Inhoud

Voorwoord	iii
Samenvatting	v
Afkortingen en begrippen	ix
1. Inleiding	1
2. Signalering en vangnetfunctie	3
2.1 Stofspecifieke gegevens voor de CTT bioassays	6
2.2 Betrouwbaarheid en validiteit	14
2.3 Mengseltoxiciteit	19
2.4 Vangnetfunctie	20
2.5 Conclusies signalering en vangnet	22
3. Verkennende berekeningen t.a.v. diskwalificatie	25
3.1 Database gegevens 1999-2004	25
3.2 Beoordeling op basis van biotesten	26
3.3 Samenhang met chemische parameters en omgevingsvariabelen	28
Referenties	29
Appendix I. Publicaties testorganismen in ISI-WoK	37
Appendix II. Frequentieverdeling van de respons in de verschillende biotesten over alle havenvakken (periode 1999-2004)	45
Appendix III. Correlatie-analyse (Spearman's Rho - non-parametrisch)	47

Voorwoord

In het kader van het project “Beleidsagenda Zoute Bagger” wordt door het RIKZ een evaluatie uitgevoerd van bestaande en nieuwe bioassays voor de beoordeling van baggerspecie. In deze rapportage zijn voor de onderdelen “Signalering en Vangnet” en “Diskwalificatie” bijdragen opgenomen. De nadruk ligt op het samenvatten en evalueren van reeds door RIKZ verzamelde informatie (o.a. de publicaties beschikbaar via www.zeeslib.nl), aangevuld met ongepubliceerde RIKZ gegevens en beperkt literatuur onderzoek. Voor het onderdeel diskwalificatie zijn bestaande gegevens uit de Speciebos database (1999-2002) aangevuld met beoordelingsgegevens verzameld in het kader van de Uniforme Gehalten Toets (UGT) en de Chemie Toxiciteits Toets (CTT) voor de periode 2003-2004.

Het project werd vanuit het RIKZ begeleid door Louis Peperzak (deelprojectleider), Cor Schipper (projectleider) en Hans Klamer. Wij danken de begeleiders voor hun bijdragen, Serge Rotteveel (RIZA) voor aanlevering van toxiciteits- en andere gegevens met betrekking tot de Microtox en DR-CALUX testen, D. de Zwart (RIVM) voor toxiciteits gegevens uit de E-TOX database, Rene de Leeuw voor aanlevering van de UGT-CTT beoordelingsgegevens over 2003-2005, en Timo Hamers voor commentaar op concept teksten.

Samenvatting

In het kader van het project “Beleidsagenda Zoute Bagger” van het RIKZ is een evaluatie uitgevoerd van bestaande en nieuwe bioassays voor de beoordeling van baggerspecie en hun geschiktheid voor signalering en vangnetfunctie (voor onbekende of niet-gemeten stoffen en mogelijke mengseltoxiciteit) en voor mogelijke diskwalificatie. Hierbij is met name ingegaan op de volgende aspecten: gevoeligheid van de test voor stoffen en mengselinteracties, de mate van betrouwbaarheid en de validiteit van de test.

In het huidige, sinds 2004 van kracht zijnde, beoordelingsstelsel (de Chemie Toxiciteits Toets, CTT) wordt gewerkt met een drietal bioassays: de 10-dagen test met de slijkgarnaal (*Corophium volutator*), de 20-minuten Microtox Solid Phase test (Microtox-SP, MSP) met de mariene bacterie *Vibrio fischeri*, en de 24-h *in-vitro* DR-Calux test met een cellijn van rattelever. Uit recente projecten zijn twee kandidaat-testen naar voren gekomen: een chronische variant (49-d) van de slijkgarnaaltest en een 14-d test met gekweekte zeeklitten (*Echinocardium cordatum*).

Zowel voor de mariene bacterie *Vibrio fischeri* als de DR-CALUX test zijn voor een grote hoeveelheid stoffen gegevens voorhanden en is uit vergelijkend onderzoek gebleken dat beide testen als gevoelig beschouwd kunnen worden voor de effecten van een breed spectrum aan stoffen (*Vibrio fischeri*), dan wel voor specifieke target stoffen met een dioxineachtig werkingsmechanisme (DR-CALUX). In het geval van de mariene bacterie betreft het gegevens uit de standaard Microtox test zonder sediment en voor een groot deel goed wateroplosbare stoffen, die slechts in beperkte mate relevant zijn voor sedimentbeoordeling. Voor de in de CTT toegepaste Microtox-SP zijn echter nauwelijks gegevens voorhanden uit spiked-sediment tests met afzonderlijke stoffen om een dergelijke beoordeling te onderbouwen, maar lijkt de veronderstelde gevoeligheid van de bacterie *Vibrio fischeri* alleen waarschijnlijk, voor zover het stoffen betreft die onder de testcondities door snelle desorptie (< 30 minuten) aan de waterfase afgegeven kunnen worden.

Voor de 10-d slijkgarnaaltest (*Corophium volutator*) en de test met de zeeklit (*Echinocardium cordatum*) zijn slechts beperkt gegevens beschikbaar uit toxiciteitstesten met specifieke stoffen en betreft in het geval van *Corophium* deels niet voor sedimentverontreiniging relevante stoffen. Op grond van vergelijkend onderzoek met whole-sediments lijkt de slijkgarnaal als relatief gevoelig beschouwd te mogen worden ten opzichte van verwante soorten amphipoden en andere testorganismen. Voor alle *in-vivo* testen (slijkgarnaal, zeeklit, mariene bacterie) geldt, dat de beschikbare informatie overwegend betrekking heeft op acute toxiciteit, en dat de informatie over chronische toxiciteit voor deze soorten zeer beperkt is.

Voor de standaard Microtox test en DR-CALUX test zijn meerdere mengseltoxiciteitsstudies uitgevoerd, op grond waarvan duidelijk is dat deze testen zeer gevoelig kunnen zijn voor effecten van complexe mengsels. Voor de Microtox-SP, *Corophium* en *Echinocardium* zijn te weinig spiked-sediment tests met mengsels uitgevoerd om hier conclusies over te kunnen trekken.

Wat betreft de prestatiekenmerken en kwaliteitsbewaking van de huidige CTT-biotesten lijkt op dit moment alleen de DR-CALUX voldoende robuust en in overeenstemming met internationale eisen en inzichten op vergelijkbare terreinen (voedselveiligheid) om een volwaardige signalerende en vangnetfunctie voor de aanwezigheid van dioxine-achtige stoffen te kunnen vervullen. Indien ten aanzien van extractie en opzuivering in het standaardvoorschrift (protocol Specie-07E) gekozen wordt voor een systeem, waarbij alleen dioxineachtige stoffen (in engere zin) overblijven (multi-layer clean-up), zou deze test mogelijk ook voor diskwalificerende doeleinden in aanmerking kunnen komen. Voor de overige CTT testen (Microtox-SP, 10-d *Corophium*) lijken de prestatiekenmerken (met name de kans op vals-positieve en negatieve uitslagen) nog onvoldoende voor diskwalificatie en wordt aanbevolen de functie beperkt te houden tot signalering en de in de huidige CTT opgenomen voorschriften voor nader onderzoek. Ten aanzien van de Microtox-SP test wordt aanbevolen om additionele testen op te nemen met de standaard Microtox test aan poriewater of biomimetisch gedoseerde systemen. Het verdient verder aanbeveling om in de huidige protocollen meer expliciete richtlijnen en rapportageverplichtingen op te nemen ten aanzien van de controle van de herhaalbaarheid.

Voor de nieuw voorgestelde testen (de chronische slijkgarnaaltest en de zeeklittest met gekweekte dieren) is nog onvoldoende materiaal beschikbaar om een beoordeling te kunnen geven van de gevoeligheid en robuustheid.

De signalerende functie van de huidige *in-vivo* testen (slijkgarnaal, Microtox-SP) is beperkt en geeft onvoldoende informatie over: sublethale effecten, chronische effecten, effecten bij gevoelige levensstadia, een aantal relevante werkingsmechanismen, waaronder hormoonverstoring, risico's van doorvergiftiging, en effecten op hogere integratieniveaus (populatie, ecosysteem niveau). Ten aanzien van voor het beleid relevante stofgroepen, lijkt de signalerende functie voor PBT, vPvB en CMR stoffen beperkt.

Samenvattend kan gesteld worden dat met de biotesten in de CTT een beperkte signalerende functie wordt vervuld maar dat de huidige drie testen niet gezien kunnen worden als een dekkend vangnet voor onbekende stoffen en mengsels. Afgezet tegen de inspanningen gericht op het verder verbeteren en verfijnen van de bestaande testen, zou overwogen kunnen worden om verbetering van de vangnetfunctie te realiseren door uitbreiding met additionele soorten (algen, vis-embryo) en werkingmechanismen (hormonale verstoring).

Op grond van verkennende berekeningen met de aangevulde database van metingen en bepalingen in het kader van de UGT en CTT voor de periode 1999 t/m 2004 werd geconstateerd dat, indien de huidige bioassays een diskwalificerende functie zouden hebben, het percentage afgekeurde vakken gemiddeld zou stijgen van 11% (op grond van de huidige CTT) naar 28% (CTT uitgebreid met diskwalificatie op basis van de biotesten). In 80% van de gevallen zal een overeenkomstige toewijzing plaats vinden op grond van chemische of biologische beoordeling (72% goedgekeurd in beide systemen, 8% afgekeurd in beide systemen). In 20% van de gevallen is de toewijzing verschillend.

Een eerste beperkte en voorlopige statistische analyse van de gegevens (non-parametrische correlatie, multiple regressie) lijkt het beeld te bevestigen van een beperkte of ontbrekende samenhang van de respons in de biotesten met chemische parameters of sedimentkarakteristieken en dat de chemische en biologische beoordeling complementair kunnen zijn.

Afkortingen en begrippen

ClogP	Software programma voor de voorspelling van de n-octanol/water partitiecoëfficiënt van stoffen vanuit structuur-eigenschappen (Biobyte, Claremont, CA, USA)
<i>Corophium volutator</i>	Slijkgarnaal
CTT	Chemie Toxiciteits Toets voor de beoordeling van zoute baggerspecie (Staatscourant 5 juli 2004) in het kader van de WVZ en WVO
DR-Calux	Dioxin Responsive Chemical Activated Luciferase gen expressie assay, biologische test voor de bepaling van de totale hoeveelheid stoffen met een dioxineachtig werkingsmechanisme
EC50	Mediane effect concentratie, waarbij 50% van de organismen een bepaald effect vertoont
<i>Echinocardium cordatum</i>	Zeeklit
<i>in vitro</i>	Test of experiment met orgaan, weefsel of celkweek van organisme
<i>in vivo</i>	Test of experiment met levend en intact organisme
ISI-WoK	Institute of Scientific Information (London, UK) – Web of Knowledge; on-line database van publicaties in internationale wetenschappelijke tijdschriften
Kow	n-octanol/water partitiecoëfficiënt
KRW	Kader Richtlijn Water
LC50	Mediane lethale effect concentratie, waarbij 50% van de organismen mortaliteit vertoont
Microtox solid-phase test, Microtox-SP, MSP	Gestandaardiseerde test met <i>Vibrio fischeri</i> blootgesteld aan een suspensie van sediment of baggerspecie
Microtox TM	Gestandaardiseerde test voor waterige monsters met <i>Vibrio fischeri</i> ontwikkeld door AZUR Environmental, Newark, Delaware (USA)
OSPAR, OSPARCOM	Oslo and Parijs Conventie voor de bescherming van het mariene milieu van de North-East Atlantic
PBT	Persistente, bioaccumulatieve en toxische verbindingen
vPvB	Zeer persistente en zeer bioaccumulatieve verbindingen
CMR	Stoffen met carcinogene of mutagene eigenschappen of effecten op de voortplanting
REACH	Registratie, evaluatie en Autorisatie van Chemicaliën, voorstel van EC voor nieuw beoordelingssysteem van stoffen
Specie-01	RIKZ standaardvoorschrift (protocol) voor de uitvoering van de 10-dagen test met <i>Corophium volutator</i> (slijkgarnaal) blootgesteld aan sediment of baggerspecie
Specie-02	RIKZ standaardvoorschrift (protocol) voor de uitvoering van Microtox solid-phase (MSP) test met de marine bacterie <i>Vibrio fischeri</i> blootgesteld aan een suspensie van sediment of baggerspecie
Specie-03	RIKZ standaardvoorschrift (protocol) voor de uitvoering van de 14-dagen test met <i>Echinocardium cordatum</i> (zeeklit), blootgesteld aan sediment of baggerspecie

Specie-07 / 7E	RIKZ standaardvoorschrift (protocol) voor de uitvoering van de DR-Calux test; 7 ^E : idem voor de uitvoering van extractie en voorbewerkingen van het sediment of baggerspeciemonster
Speciebos	Beslissingsondersteund systeem (BOS) voor de beoordeling van zoute baggerspecie. Database met meetgegevens in zoute baggerspecie 1999 t/m 2002 beheerd door RIKZ
TAC	Test acceptatie criteria
TEQ	toxische equivalente concentratie, ten opzichte van 2,3,7,8-TCDD
TGD	Technical Guidance Document; protocol gebruikt voor de risicobeoordeling van bestaande en nieuwe chemische stoffen
UGT	Uniforme Gehalten Toets, tot 2004 van kracht zijn beoordelingssysteem voor zoute baggerspecie
<i>Vibrio fischeri</i>	Luminiserende mariene bacteriesoort, gebruikt in de Microtox solid-phase test
WVO	Wet Verontreiniging Oppervlaktewater
WVZ	Wet Verontreiniging Zeewater

1. Inleiding

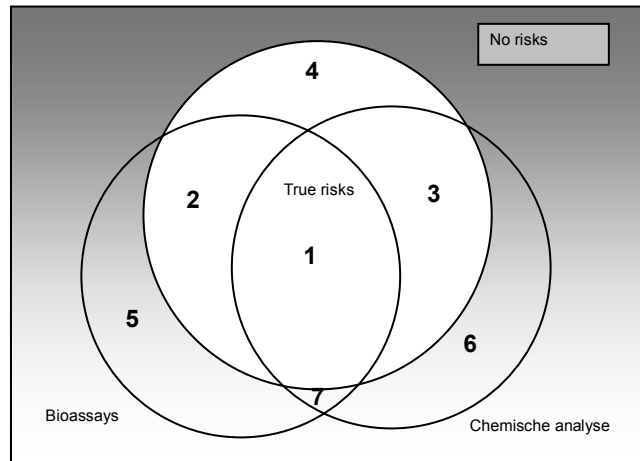
In het kader van het project “Beleidsagenda Zoute Bagger” wordt door het RIKZ een evaluatie uitgevoerd van bestaande en nieuwe bioassays voor de beoordeling van baggerspecie. In het huidige, sinds 2004 van kracht zijnde, beoordelingsstelsel (de Chemie Toxiciteits Toets, CTT) wordt gewerkt met een drietal bioassays: de 10-dagen test met de slijkgarnaal (*Corophium volutator*), een 20-minuten test met de Microtox Solid Phase test (Microtox-SP, MSP) met de mariene bacterie *Vibrio fischeri*, en de 24-h *in-vitro* DR-Calux test met een cellijn van rattelever. Uit recente projecten zijn twee kandidaat-testen naar voren gekomen: een chronische variant (49-d) van de slijkgarnaal-test en een 14-d test met gekweekte zeeklitten (*Echinocardium cordatum*).

De in 2006 af te ronden evaluatie van de biotesten zal bestaan uit de volgende te beoordelen aspecten: robuustheid (A), relevantie (B), signalering (C) en diskwalificatie (D). Het IVM is gevraagd om een bijdrage te leveren voor de onderdelen signalering en diskwalificatie. De nadruk ligt in deze rapportage primair op het samenvatten en kritisch evalueren van reeds door RIKZ verzamelde informatie (www.zeeslib.nl). Waar nodig zijn deze gegevens aangevuld met informatie uit literatuur onderzoek. Gezien de looptijd en het beschikbare budget viel een uitgebreide literatuurstudie buiten de orde van het project. Om redundantie met andere onderdelen te vermijden zijn in een aantal gevallen verwijzingen gegeven naar de desbetreffende hoofdstukken (A) en (B).

Met de bij de baggerspeciebeoordeling gevolgde geïntegreerde benadering van zowel chemische als biologische karakteristieken kan in principe een meer adequate en beter onderbouwde inschatting gemaakt worden van de ecologische risico's van verontreinigde baggerspecie dan op basis van de traditionele stofgerichte beoordeling, waarbij alleen naar de aanwezigheid en gehalten van specifieke stoffen of stofgroepen wordt gekeken. De relatief beperkte set van stoffen en stofgroepen in de CTT beoordeling ten opzichte van andere nationale en internationale lijsten van prioritaire stoffen (WFD, OSPAR) maakt dat alleen een stofgericht spoor onvoldoende bescherming zou bieden tegen de simultane blootstelling aan complexe mengsels van bekende en onbekende stoffen en/of hun omzettingproducten. Het palet van relevante verontreinigingen is in de loop van de afgelopen jaren veranderd. Traditionele stoffen als gechloreerde bestrijdingsmiddelen zijn voor de Nederlandse kustwateren minder belangrijk geworden. In een recente evaluatie zijn met name Cd, Hg, TBT, olie en PCB's benoemd als 'contaminants of concern' in baggerspecie (Stronkhorst en Van Hattum, 2003). Daarnaast zijn talrijke 'nieuwe' stoffen zoals bijvoorbeeld surfactanten, vlamvertragers en weekmakers in betekenis toegenomen (Akerman et al., 2004).

Ondanks het feit dat het onderzoek naar effecten van gecombineerde blootstelling aan complexe mengsels nog sterk in ontwikkeling is, zijn er voor specifieke stofgroepen en werkingsmechanismen duidelijke bewijzen dat het werken met grenswaarden voor enkelvoudige stoffen niet toereikend is (Van Leeuwen et al., 1996; Legler, 2001; Warne, 2003) en onvoldoende bescherming biedt. Bij de beoordeling van milieubezwaarlijkheid van effluënten en afval- en reststoffen kan aanvullend gebruik van biologische beoordeling hier deels in voorzien. Daarnaast is bekend dat sommige stoffen extreem sterk gebonden kunnen zijn aan sediment en er sprake kan zijn van een lage biologische

beschikbaarheid. In deze situaties zou een louter stofgericht spoor zonder correcties voor de verwachte biologische beschikbaarheid juist tot een te conservatieve beoordeling kunnen leiden. In het aan Stronkhorst et al. (2003) ontleende diagram (figuur 1.1) is geïllustreerd op welke wijze chemische en biologische testen in een geïntegreerde beoordeling elkaar kunnen aanvullen en een bijdrage kunnen leveren aan een 'weight of evidence' benadering (segment 1).



Figuur 1.1 Venn-diagram van sterkte en zwakte van een geïntegreerde chemische en bioassay-gebaseerde beoordeling van sediment. Het oppervlak van de witte cirkel (1-4) stelt het theoretische gebied voor met werkelijke ecologische risico's. Toelichting van de verschillende segmenten in de tekst. Ontleend aan Stronkhorst et al. (2004).

De toepassing van bioassays kan een signalerende functie hebben voor (niet gemeten) onbekende stoffen of onbekende interacties van complexe mengsels van stoffen (segment 2) of kan helpen om situaties met lage biobeschikbaarheid op te sporen (segment 6). Een vals-positieve respons in de bioassays (segment 5 en 7) kan duiden op de aanwezigheid van versturende omstandigheden tijdens de test (confounding factors); een vals-positieve respons in de chemische benadering (segment 6 en 7) kan duiden op een lage biologische beschikbaarheid (segment 6). Segment 3 en 4 vormen de situaties waarin de gekozen bioassays onvoldoende bescherming bieden (niet beschouwde werkingsmechanismen, onvoldoende gevoelige soorten). Segment 2 en 4 geven de beperkingen aan van de chemische benadering (onbekende stoffen en mengselinteracties). Bijzondere aandacht verdienen de situaties van samenvallende vals-negatieve toewijzingen (segment 4) of vals-positieve toewijzingen (segment 7) die beide de beperkingen van de beoordelingsmethode karakteriseren.

Bij de opzet van de CTT en de uiteindelijke gekozen bioassays is uitgegaan van een signalerende functie van de bioassays, voornamelijk gericht op het karakteriseren van mogelijke milieubezwaarlijkheid (hazard) en niet zozeer op een ecologische risicobeoordeling. In het laatste geval zou een meer omvattende batterij van testen en blootstellings-scenario's noodzakelijk zijn, op grond waarvan extrapolatie naar de waarschijnlijkheid van effecten in het ontvangende milieu mogelijk zou zijn. In de huidige rapportage zal vooral ingegaan worden op de binnen de CTT gekozen hazard-assessment gerichte benadering.

2. Signalering en vangnetfunctie

Bij het beantwoorden van de vraag in hoeverre de set van biotesten een signalerende en vangnetfunctie kunnen vervullen voor de aanwezigheid en milieubezwaarlijkheid (hazard assessment) van onbekende (niet gemeten) stoffen in baggerspecie en mengsel-toxiciteit zijn in eerste instantie o.a. de volgende aspecten van belang:

Signalerende functie:

- De testbatterij dient voldoende gevoelig te zijn voor een breed spectrum aan mogelijke stoffen, omzettingsproducten en mengselinteracties;
- De testbatterij dient voldoende gestandaardiseerd en robuust te zijn met betrekking tot een aantal prestatiekenmerken en methodologische aspecten (herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, constante gevoeligheid, lage kans op vals-positief / vals-negatief).

Vangnetfunctie

- De gekozen ‘endpoints’ van de testbatterij dienen voldoende gevoelig en representatief te zijn voor de veelheid aan mogelijke werkingsmechanismen en interacties voor een veelheid van soorten, bij verschillende blootstellingsduur, en op verschillende biologische integratieniveaus (moleculair, cellulair, orgaan, individu, populatie, ecosysteem).

Daarnaast kunnen de volgende criteria een rol spelen (Nenzda, 2001):

- Kostenefficiëntie (snelheid en lage kosten);
- Uitvoerbaarheid (beschikbaarheid van organismen, hanteerbaarheid in het laboratorium);
- Geschiktheid van type test (laboratorium assay, mesocosmos, biomarker) voor de te onderzoeken matrix (sediment, elutriaat, poriewater, extract);
- Ecologische relevantie (voor het ontvangende systeem);
- Internationale acceptatie en inpasbaarheid in internationale monitoringprogramma's;
- Aansluiting bij methoden in hogere TIER beoordeling en/of aanvullend onderzoek;
- Aansluiting bij ecologische risicobeoordeling;
- Ethische aspecten.

Bij het gebruik van bioassays voor ecologische risicobeoordeling, zijn met name de volgende criteria van belang: het omvatten van voldoende trofische niveaus en functies om extrapolaties te kunnen maken, ecologische relevantie van de gekozen soorten en endpoints.

De inspanningen en discussies rondom het tot stand komen van het REACH-programma hebben duidelijk gemaakt dat op dit moment slechts voor een beperkt aantal stoffen voldoende informatie beschikbaar is om de humane en ecologische risico's in te schatten. Schattingen van het totale aantal door de mens geproduceerde stoffen bedragen 150.000 of meer (De Zwart, 2005). Bij de recente behandeling in het Europese Parlement van het concept REACH-programma is het aantal stoffen waarop het programma betrekking heeft onder druk van de industrie beperkt tot ca. 8000 stoffen. In een door het RIZA uitgevoerde studie in het kader van het project “Vergeten Stoffen” zijn in Rijn- en

Maaswater vele honderden verschillende stoffen teruggevonden (Berbee et al., 2004), die niet opgenomen waren in lopende monitoringsprogramma's. Met de sterke vooruitgang van de huidige chemische analysetechnieken kunnen tegenwoordig veel meer stoffen aangetoond worden. Ook op internationale congressen is tegenwoordig veel aandacht voor "emerging contaminants". Binnen diverse internationale verdragen (b.v. OSPAR, HELCOM, Internationale Rijn Commissie) en Europese of nationale wetgeving zijn ca. 600 stoffen in beschouwing genomen en opgenomen op lijsten van prioritaire stoffen (Van Wezel, 1999). Binnen de Kaderrichtlijn Water zijn 31 stoffen en groepen van stoffen aangewezen als prioritaire stoffen. In het kader van het POR-2 project in opdracht van het Gemeentelijk Havenbedrijf Rotterdam is door Gandrass et al. (2002) een overzicht gemaakt van de mate van harmonisatie van verschillende nationale en internationale prioriteitslijsten van belang voor de beoordeling van sedimentgebonden stoffen; de lijsten komen slechts in beperkt te mate overeen en een gering aantal stoffen is op alle lijsten terug te vinden. In het stofgerichte beleid (Reach, KRW, OSPAR) is de aandacht in sterke mate gericht op het verminderen van risico's van z.g. PBT, vPvB en CMR stoffen (PBT: persistent, bioaccumulatief, toxisch; vPvB: very persistent, very bioaccumulative; CMR: carcinogene, mutagene stoffen en stoffen met effecten op de reproductie). Met name de PBT en vPvB stoffen hebben in veel gevallen ook een grote affiniteit voor sediment.

Tabel 2.1 Voorbeelden van verschillende soorten effecten, werkingsmechanismen en endpoints op verschillende biologische integratieniveaus en temporele schaal.

Endpoints	Werkingsmechanismen	Ecosysteemparameters
Mortaliteit	Narcosis neutrale stoffen	<i>Funcities</i>
Immobiliteit	Narcosis polaire stoffen	Primaire productie
Groei, productiviteit	Neurotoxiciteit	Biomassaproductie
Consumptie	Mutageniteit, Carcinogeniteit	Respiratie
Respiratie	Teratogeniteit	Mineralisatie
Reproductie	Enzyminductie (b.v. P450)	Energie-fluxen
Gedrag	Hormonale verstoring (remming/stimulatie; b.v. oestrogen, androgeen, schildklier)	Nutriënten-fluxen Adaptatie en regeneratie
		<i>Structuur</i>
Temporeel	Biologisch integratieniveau	Abundantie, dynamiek soorten,
Acuut	Moleculair subcellulair	Biodiversiteit indices
Chronisch	Cel	Biomassa, grootte
Life-stage	Weefsels/organen	Predator-prooi interacties
Meer generatie testen	Individu/organisme	Competitie, parasitisme
	Soort/populatie	Trofische structuur
	Gemeenschappen (biocenoses)	
	Ecosystemen	

In tabel 2.1 is een voorbeeld gegeven van verschillende typen effecten en werkingsmechanismen op verschillende biologische integratieniveaus. In principe zou de gekozen testbatterij voldoende responsief moeten zijn om als 'early warning' instrument bescherming te kunnen bieden tegen nader te definiëren soorten effecten. Het is duidelijk

dat geen enkele testbatterij waarschijnlijk ooit voldoende dekkend zou kunnen zijn om tegen al deze soorten effecten te beschermen. In de praktijk wordt in kaders van ecologische risicobeoordeling (TGD, 1996; OSPARCOM, 1998) vaak aanbevolen om op zijn minst over testgegevens van 2-4 verschillende soorten te kunnen beschikken, liefst van verschillende trofische niveaus. In de Amerikaanse praktijk wordt voor de beoordeling van baggerspecie gewerkt met een getrapt systeem (Tier I-IV) en wordt voor de TIER-IV beoordeling aanbevolen om met minstens 3 soorten van verschillend trofisch niveau te werken voor de waterfase en minstens 3 benthische soorten met verschillende voedselstrategie (filterfeeder, deposit feeder) of levenswijze (in of op het sediment levend) voor de sedimentfase (Munns et al., 2002).

In de op dit moment grootste database met op kwaliteit beoordeelde toxiciteitsgegevens voor aquatische organismen, de Aquire database van de Amerikaanse EPA, zijn op dit moment gegevens opgenomen voor ca. 8500 stoffen in relatie tot een of meer van 5900 soorten aquatische organismen (EPA, 2002; CSC, 2003). Door verschillende auteurs (De Zwart, 2002; Posthuma et al., 2002) is een analyse gemaakt van trends in de gevoeligheid van soorten, waarvan gegevens zijn opgenomen in Aquire en vergelijkbare databases. In veel gevallen blijken effecten in hoge mate stof- en soortspecifiek en zijn er met uitzondering van specifieke werkingsmechanismen slechts in beperkte mate generalisaties mogelijk. Nauw verwante soorten en taxa kunnen per stof onderling sterk verschillen in gevoeligheid. Alleen voor stoffen met een overeenkomstig werkingsmechanisme in specifieke organismen kunnen er soms duidelijke trends zijn, zoals b.v. bij herbiciden, waar hogere planten en algen vaak meer gevoelig dan bijvoorbeeld vissen en ongewervelden. Voor narcotische effecten blijken veel organismen bij een overeenkomstige interne dosis effecten te vertonen en kan met de “Critical / Lethal Body Burden” benadering (CBB, LBB) een groot deel van de toxiciteit in organismen worden verklaard of voorspeld (McCarty et al., 1993; Van Wezel et al., 1995).

Voor de ecologische risico evaluatie zijn statistische technieken ontwikkeld om op basis van de grote range aan verschillen in gevoeligheid z.g. ‘species sensitivity distributions’ (SSD) af te leiden (Posthuma et al., 2002). Door extrapolatie vanuit deze (vaak log-logistische) verdelingen van gevoeligheid van verschillende soorten per stof kunnen grenswaarden worden afgeleid voor de normstelling (MTR/VR; VROM, 2004) of voor de risicobeoordeling van stoffen (TGD, 1996), of omgekeerd voor de voorspelling van te verwachten effecten in het veld op grond van waargenomen concentraties (De Zwart en Sterkenburg, 2002).

Voor de praktijk van de beoordeling van verontreinigd sediment zijn er diverse testen waarvoor protocollen in de literatuur zijn beschreven. Uit Noord-Amerikaanse studies (Munns et al., 2002), waar al sinds vele jaren met effectgerichte beoordeling wordt gewerkt, zijn op dit moment protocollen beschikbaar voor de beoordeling van sediment uit zoete en mariene watersystemen (toxiciteit en/of bioaccumulatie) op basis van meer dan 50 soorten, verdeeld over verschillende taxonomische groepen: kreeftachtigen (n=21), tweekleppigen (n=7), wormen (n=9), vissen (n=13), insecten (n=3), stekelhuidigen (n=3). In een door Nendza (2002) gemaakt overzicht van geschikte sedimenttesten voor toepassing in Duitsland en in internationale monitoringprogramma’s zijn enkele tientallen (groepen van) testen beschreven, waarvoor protocollen of guidelines zijn ontwikkeld. Een selectie van ca. 35 testen is uitgebreid geëvalueerd op bruikbaarheid voor verschillende soorten van hazard- en risk-assessment.

De in de CTT opgenomen bioassays zijn primair bedoeld voor hazard-assessment en productbeoordeling (Schipper en Schout, 2004) en omvatten 2 soorten organismen (bacterie, ongewervelde) en een gemodificeerde zoogdiercellijn (ratlever). De *in-vivo* testen (Microtox-SP en 10d-*Corophium* test) hebben een beperkte blootstellingstijd en geven vooral inzicht in de acute toxiciteit van de beschikbare fractie van sedimentgebonden stoffen. De DR-Calux assay met extracten van sediment geeft een inzicht in de totale concentratie van dioxineachtige stoffen als indicatie van mogelijke risico's van deze stoffen op hogere trofische niveaus. De endpoints van de testen hebben betrekking op overleving (*Corophium*), groei, metabolisme (Microtox) en activatie van de Ah-receptor (DR-CALUX test voor dioxineachtige verbindingen), en geven geen informatie over andere soorten toxiciteit of effecten op andere integratie niveaus. De nieuw voorgestelde chronische variant van de slijkgarnaalttest (Kooman, 2005) zou meer inzicht kunnen verschaffen in chronische effecten en een gevoeliger soort effecten (groei, reproductie). De voor de CTT gekozen soorten in de *in-vivo* testen (*Vibrio fischeri* en *Corophium*) zijn vaak ook onderdeel van de sets van biotesten toegepast in Noord-Amerika, Duitsland, UK en enkele andere landen.

De in volgende hoofdstukken geschetste beperkingen en onzekerheden van de biotesten zijn niet specifiek voor de CTT of testen voor de beoordeling van baggerspecie maar gelden *mutatis mutandis* ook voor testen toegepast bij de beoordeling van afvalwater, stoffen, producten en humane risicobeoordeling. Bij de beoordeling van de onzekerheden die gepaard gaan met de toepassing van bioassays in vergelijking met alleen op chemische parameters gebaseerde beoordelingssystemen, dient beseft te worden, dat bij de chemische beoordeling alleen wordt ingezoomd op bekende (probleem)stoffen en de onzekerheden ten aanzien van niet gemeten stoffen, mengselinteracties, biotransformatie en biologische beschikbaarheid buiten beeld blijven.

2.1 Stofspecifieke gegevens voor de CTT bioassays

Om een uitspraak te kunnen doen in hoeverre de voor de CTT gehanteerde soorten voldoende gevoelig zijn voor specifieke stoffen zijn korte searches uitgevoerd in een aantal databases, waaronder de Aquire/Ecotox database onderhouden in opdracht van de US-EPA (CSC, 2003), de in Nederland door het RIVM onderhouden E-tox database (De Zwart, 2005) en een commerciële database Terrabase (Terrabase, 1999) waarin data over de mariene bacterie *Vibrio fischeri* (Microtox test) worden bijgehouden. Het gaat hier om gegevens over de standaard Microtox test zonder sediment; over de Microtox solid phase test (Microtox-SP, MSP) is geen informatie opgenomen. Daarnaast is in de ISI Web of Knowledge geïnteriseerd hoeveel publicaties over toxiciteitstudies met de betreffende soorten zijn uitgevoerd (zie tabel 2.2 en appendix I).

Verreweg de meeste gegevens zijn beschikbaar voor de standaard Microtox test, die al sinds het midden van de '80er jaren in gebruik is. In de oudere publicaties is de gebruikte soort vooral aangeduid als *Photobacterium phosphoreum*; volgens informatie van de leverancier is de gebruikte soort later geclassificeerd als *Vibrio fischeri* (AZUR, www.azureenv.com). In een recente review over bioluminescerende bacteriën (Nunes-Halldoson & Duran, 2003) worden de soorten als apart onderscheiden. In de Microtox en Microtox SP test (Doherty, 2001) wordt vooral gewerkt met een specifieke strain van *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). In de Terrabase (Terrabase 1999) zijn voor 744 stoffen

gegevens opgenomen. In een door Klamer (RIKZ, ongepubliceerde gegevens) gemaakt overzicht is dit aangevuld met meer recente literatuurgegevens en zijn voor 1200 stoffen gegevens opgenomen. Voor *Corophium* zijn in de Aquire database voor 17 stoffen gegevens opgenomen, waarvan voor 3 stoffen alleen gegevens over bioaccumulatie. In de E-Tox database van het RIVM, waarbij een strengere selectie op de kwaliteit van de basisgegevens wordt aangehouden, zijn voor 7 stoffen gegevens voor *Corophium* opgenomen. De zeeklit *Echinocardium cordatum* komt niet voor in de Aquire database; in de E-Tox database van het RIVM zijn voor de zeeklit slechts voor 1 stof (TBT) gegevens opgenomen.

Tabel 2.2 Aantallen vermeldingen van toxiciteitsgegevens van de verschillende biotesten in databases en gerichte studies.

Test	Aantal stoffen waarvoor end-point (b.v. EC50, NOEC, BCF) is gerapporteerd	Bronnen	Stofgroepen, opmerkingen	Aantal citaties in ISI-WoK*
<i>Vibrio fischeri</i> (Microtox)	744	Terrabase (1998)		34
	1207	Klamer (ongepubliceerde data)		
<i>Corophium volutator</i>	17	Aquire / Ecotox (US-EPA)	291 vermeldingen	47
	7	E-toxbase (RIVM)	254 vermeldingen	
<i>Echinocardium cordatum</i>	0	Aquire / Ecotox (US-EPA)		5
	1	E-toxbase (RIVM)	TBT	
DR-CALUX	430**	Aarts en Palmer (2002)	PCDDs, PCDFs, PCBs, PAKs, PCNs, PBBs, PBDEs	85 waarvan 13 in relatie tot sediment
<i>Verwante soorten</i>				
“Sea urchin”	157	Aquire / Ecotox (US-EPA)	1018 vermeldingen 23 soorten	
“Scuds”	378	Aquire / Ecotox (US-EPA)	2726 vermeldingen 48 soorten	

* Met zoekprofiel: soortnaam + toxicity.

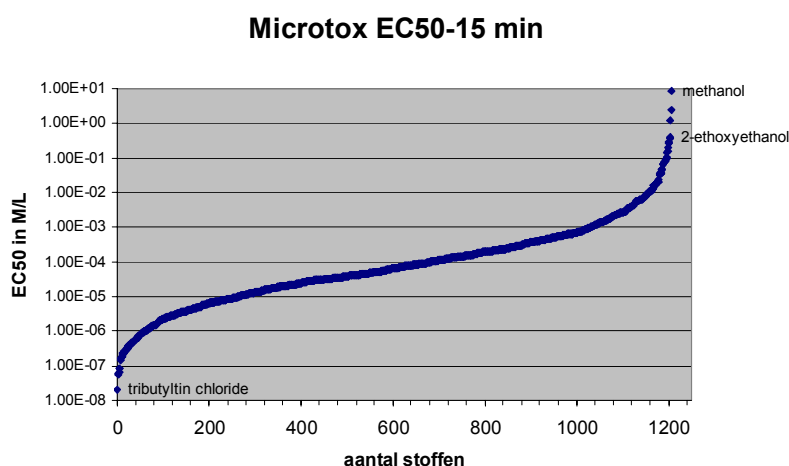
** Inclusief gegevens van vergelijkbare *in-vivo* en *in-vitro* testen gebaseerd op Ah-receptor gemedieerde effecten.

Daarnaast is geïnventariseerd in welke mate er in de Aquire database gegevens aanwezig zijn over verwante soorten bij toepassing van de zoektermen “scud” (hieronder zijn estuariene amphipoden opgenomen) en “sea urchin” (hieronder zijn alle echinodermata opgenomen). De database omvat gegevens voor 48 met de slijkgarnaal verwante soorten gegevens voor een of meer van 378 stoffen, en voor 23 soorten stekelhuidigen gegevens voor een of meer van 157 verschillende stoffen. Met nadruk zij gesteld dat grote stof-

specifieke variaties in gevoeligheid kunnen optreden binnen verwante groepen soorten en dat de gegevens geen aanknopingspunt bieden voor extrapolaties (zie o.a. De Zwart, 2002).

Standaard Microtox en Microtox-SP (MSP)

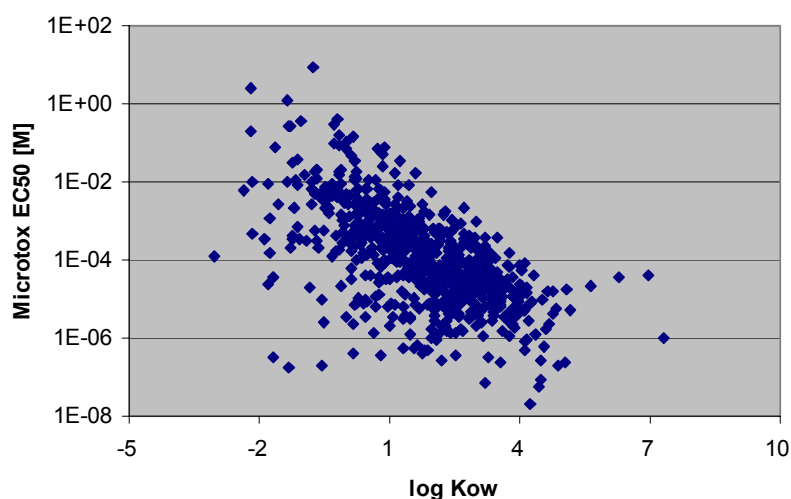
De door Klamer (RIKZ, ongepubliceerde gegevens) verzamelde EC₅₀ (15 min.) waarden voor de standaard Microtox test (zonder sediment), gebaseerd op de Terrabase gegevens en aangevuld met recente literatuur, zijn weergegeven in figuur 2.1 en geordend naar afnemende toxiciteit weergegeven. In de meeste gevallen betreft het nominale blootstellingsconcentraties, waarbij geen controle heeft plaatsgevonden van de werkelijke concentraties tijdens de blootstelling. De gevoeligheid voor de verschillende stoffen varieert over meer dan 8 ordes van grootte, uiteenlopend van 0.02 µM/L voor tributyltin-chloride tot 8 M/L voor methanol. Naast de stofs specifieke verschillen representeert de weergegeven range ook de verschillen in testcondities die de toxiciteit kunnen beïnvloeden (biobeschikbaarheid, waterkarakteristieken). Met uitzondering van de spiked-sediment studies met minerale olie van Brils et al. (2002) zijn geen stof- of stofgroep-specifieke gegevens bekend voor de MSP test. Daar het om dezelfde strain van *Vibrio fischeri* gaat zal vooral de sediment-water partitie bepalend zijn in hoeverre de MSP test een vergelijkbare gevoeligheid heeft als de standaard Microtox test. Daar in de MSP test de desorptie van stoffen onder de testcondities niet goed is te voorspellen (zie ook sectie 2.2), kunnen de bevindingen voor de standaard Microtox test niet eenvoudig naar de MSP test worden geëxtrapoleerd.



Figuur 2.1 Microtox EC₅₀ (15 min) waarden in M/L voor 1207 stoffen geordend naar afnemende toxiciteit. Bron: Klamer (RIKZ, ongepubliceerde gegevens).

In figuur 2.2 zijn gegevens (EC₅₀-15 min) voor ca. 750 stoffen samengevat ontleend aan de database van Klamer (ongepubliceerde gegevens), en waarbij een screening heeft plaatsgevonden op gerapporteerde EC₅₀ waarden, die hoger lagen dan de wateroplosbaarheid van de betreffende stoffen. Deze waarden zijn uit het overzicht verwijderd. De gegevens zijn als scatterplot weergegeven in relatie tot de n-octanol-water partitie-coëfficiënt (K_{ow}), zoals opgenomen in de ClogP database of berekend met dit program-

ma. Hoewel de variabiliteit in gevoeligheid meerdere ordergroottes omvat, met name voor de meer polaire stoffen ($\log Kow < 1$), vertonen een deel van de EC50 waarden voor stoffen met $\log Kow$ 1 - 4 in zekere mate een afnemende trend. Voor stoffen, waarbij een narcotisch werkingsmechanisme aannemelijk is, lijkt deze afname in overeenstemming met de critical body burden theorie (CBB; ook wel als LBB - lethal body burden - aangegeven) (McCarty and Mackay, 1993), waarbij voor meer lipofiele stoffen in het algemeen een hogere bioconcentratie wordt aangenomen. Het ontbreken van een verdere afname van de EC50 voor stoffen met $\log Kow > 4$ heeft mogelijk te maken met de korte blootstellingsduur en sterke afwijkingen van evenwichtsopname.



Figuur 2.2 Scatterplot van Microtox EC-50 (15 min) waarden (M/L) in relatie tot de *n*-octanol/water partitiecoëfficiënt (*Kow*). Gegevens ontleend aan: Klamer (ongepubliceerde gegevens). Aantal stoffen: 750.

Op basis van de gegevens van Klamer (ongepubliceerde gegevens) is geïnventariseerd dat voor ongeveer de helft van de prioritaire stoffen of stofgroepen uit de Kaderrichtlijn Water (KRW) EC-50 waarden bekend zijn voor de standaard Microtox test (Maas en Van den Heuvel-Greve, 2005). In deze laatste studie zijn aanvullende experimenten beschreven met watermonster waarin alle KRW prioritaire stoffen waren toegevoegd tot het maximaal toelaatbare risiconiveau (VROM, 2004). Extracten van deze monsters bleken na 100voudige concentratie responsief in de standaard Microtox test. Vergelijkbare testen met algen en *Daphnia* waren tot 1.5-10 maal gevoeliger.

Corophium volutator:

De belangrijkste voor de slijkgarnaal bekende gegevens zijn weergegeven in de tabellen 2.3 t/m 2.5 en omvatten gegevens voor metalen (Zn, Cu, Cd, Hg, Ni), zouten (dichromaat, arseniet), en organische verbindingen: nonylphenol, TBT, olie, propanon, fluoranteen. Van de in de E-tox database opgenomen gegevens voor de slijkgarnaal is in tabel 2.3 een selectie gemaakt van endpoints en condities (LC50, 8-10 dagen; 15 °C, saliniteit 30 ‰), die min of meer vergelijkbaar zijn met het voor de CTT gebruikte protocol (Specie 01, RIKZ, 2005a). Op grond van de overige (hier niet weergegeven) gegevens voor de slijkgarnaal in de E-tox database, blijkt dat de mediane sterfte (LC50) onder andere varieert met blootstellingsduur, saliniteit en temperatuur. De toxiciteit

neemt voor de meeste stoffen af bij afnemende blootstellingsduur, toenemende saliniteit en afnemende temperatuur. In tabel 2.4 zijn LC50 waarden uit enkele spiked-sediment testen opgenomen, waaronder de door het RIKZ geïnitieerde studies met TBT (Stronkhorst, 1999) en minerale olie (Brils et al., 2002). In de door Batt en Raffaelli (1998) uitgevoerde studie zijn de sedimenten bij een relatief korte tijdsduur (4 uur) gespiked en om die reden niet goed bruikbaar voor een beoordeling van de gevoeligheid. In tabel 2.5 zijn enkele studies uit Aquire aangegeven voor andere endpoints (groei, gedrag), waarbij geen EC50 of NOEC waarden zijn gerapporteerd of berekend konden worden, en/of die bij sterk afwijkende condities (bijvoorbeeld blootstellingsduur) zijn uitgevoerd.

Tabel 2.3 Corophium volutator – toxiciteit van stoffen in de waterfase. Selectie van gerapporteerde LC50 waarden (mg/L) bij testcondities (8-10 dagen blootstelling, 15 °C) vergelijkbaar met het protocol voor de CTT.

Stof	LC50 range mg/L	Saliniteit range ‰	Bron	Database
NiCl ₂	5 – 7.5	15 – 35	Bryant et al. (1985a)	E-tox
K ₂ Cr ₂ O ₇	2 – 7	15 – 35	Bryant et al. (1984)	E-tox
ZnSO ₄	1.1	25	Bryant et al. (1985a)	E-tox
NaAsHO ₂	1.8 – 2.6	5 – 35	Bryant et al. (1985b)	E-tox
TBT	.0002-.0004*	30	Stronkhorst et al. (1999)	E-tox
p-nonylfenol	0.6 – 0.7	25	Brown et al. (1999)	E-tox

* Poriewater concentratie.

Tabel 2.4 Corophium volutator - spiked-sediment tests. Gerapporteerde LC50 waarden (mg/kg drooggewicht) bij testcondities (8-10 dagen blootstelling, 15 °C) vergelijkbaar met het protocol voor de CTT.

Stof	LC50 range mg/kg	Saliniteit range ‰	Bron	Database
Olie				
- gasolie (DMA)	91 – 112	30	Brils et al. (2002)	
- smeerolie (HV)	8200 – 10100			
TBT	1.9 – 2.5	30	Stronkhorst et al. (1999)	E-tox
Lindaan	0.8 – 1.5	30	Ciarelli et al. (1997)	
Cu (11 °C)	32 – 43	32	Bat and Raff. (1998)	
Zn (11 °C)	28 – 36	32	Bat and Raff. (1998)	
Cd (11 °C)	9 – 23	32	Bat and Raff. (1998)	

Het is duidelijk dat voor veel van de prioritaire of aandachtstoffen in het kader van de CTT of bijvoorbeeld de Kaderrichtlijn Water (KRW) geen gegevens beschikbaar zijn over de gevoeligheid van de slijkgarnaal, en dat de huidige gegevens niet toereikend zijn om een vergelijking te maken tussen de waargenomen totale toxiciteit en de verwachte toxiciteit voor de slijkgarnaal op grond van chemische meetgegevens. Een dergelijke berekening zou inzicht kunnen verschaffen in het niet verklaarde deel van de totale toxiciteit, dat mogelijk aan onbekende niet gemeten stoffen of stofgroepen toegeschreven zou kunnen worden. Dergelijke berekeningen zijn o.a. van belang bij TIE (toxicity

identity evaluation) procedures om waargenomen effecten te kunnen koppelen aan stoffen en mogelijke bronnen.

Tabel 2.5 *Corophium volutator*- toxiciteit van stoffen in de waterfase. Overige gerapporteerde endpoints (mg/L)*.

Stof	Duur dagen	Endpoint**	Range mg/L	Opm	Bron	Database
Fluoranteen	10-30	Groei	0.016-0.022	Sign. effect	Ciarelli et al. (1999)	Aquire
p-nonylphenol	120	Groei ontwikkeling	0.01	Sign effect	Brown et al. (1999)	Aquire
2-propanon	42	Mort	0.04	Sign. effect	Brown et al. (1999)	Aquire
Cd	4	Mort	0.1-10	Sign. effect	Bat et al. (1997)	Aquire
Cd	3	Mort	2.5 – 2.8	LC50	Ciarelli et al. (1997)	
Cu	100	Mort	0.2-1	Sign. effect	Conradi et al. (1998)	Aquire
HgCl ₂	0.9	Gedrag	10-100	Sign. effect	Erdem (1980)	Aquire

* Geen data over temperatuur en saliniteit in on-line output van Aquire.

** Gerapporteerd als significant effect ten opzichte van controle; geen ECx waarden opgenomen in database.

Sublethale effecten bij lage concentraties op groei en/of ontwikkeling van juveniele slijkgarnalen zijn onder meer waargenomen in chronische blootstellingsexperimenten (120 dagen) met p-nonylphenol bij blootstellingsconcentraties vanaf 0.01 mg/L (Brown et al., 1999) en fluoranteen (30 dagen, vanaf ca. 0.02 mg/L; Ciarelli et al., 1999). De nieuw voorgestelde chronische variant van de slijkgarnaalttest (49-dagen; Kooman, 2005) geeft in principe meer inzicht in chronische effecten en een gevoeliger type van effecten (groei, reproductie). Voor deze test zijn nog geen stofs specifieke gegevens beschikbaar om een vergelijking te kunnen maken.

In de Aquire database zijn voor 48 andere soorten estuariene en mariene amphipoden gegevens opgenomen. In een vergelijkende studie met Noordzee sedimenten bleek de slijkgarnaal gevoeliger dan andere (Noord Amerikaanse) soorten amphipoden (*Rhepoxynius abronius*, *Bathyporeia sarsi*; Van den Hurk et al., 1992). Marinene amphipoden worden als relatief gevoelige en voor het ecosysteem relevante indicatoren gezien in relatie tot sediment verontreiniging (Peters et al., 2002). Door Depledge en Billingham (1999) werd *Corophium* genoemd als mogelijk geschikt test organisme in relatie tot hormonaal verstorende stoffen.

Echinocardium cordatum

Voor de test met de zeeklit zijn in de literatuur alleen stofs specifieke gegevens te vinden afkomstig uit in opdracht van het RIKZ uitgevoerde spiked-sediment studies ten aanzien van TBT (Stronkhorst et al., 1999) en minerale olie (Brils et al., 2002). De voor TBT gevonden LC50 waarden, uitgedrukt als poriewater concentraties (0.4 µg/L voor 14-d en

0.2 µg/L voor de 29-d test) waren vergelijkbaar met de poriewater LC50 voor *Corophium* (0.3 µg/L, 10-d test) en lager dan de voor de standaard Microtox test bekende waarde (EC50-15min: 5 µg/L; Klamer, ongepubliceerde gegevens). De zeeklit is - evenals de slijkgarnaal - gevoelig voor verschillen in samenstelling van complexe oliemengsels. In de door Brils et al. (2002) beschreven experimenten werd voor gasolie (DMA) met overwegend lichtere componenten (86 % C10-C22 koolwaterstoffen) een 14-d LC50 gevonden van 190 mg/kg (95CI:172-210) en voor de smeerolie met overwegend zwaardere componenten (97% C22-C40 koolwaterstoffen) LC50 waarden uiteenlopen van 910 – 3380 mg/kg.

Door Daan et al. (1990) zijn studies uitgevoerd met *Echinocardium cordatum* met betrekking tot verontreiniging (boorgruis) rondom gas- en olie productieplatforms in de Noordzee en werden zowel in het veld als in de laboratorium-bioassays (met blootstellingsduur tot 110 dagen) effecten waargenomen. In de Aquire-database zijn voor 23 andere soorten stekelhuidigen gegevens beschikbaar.

DR-CALUX

De DR-CALUX test (Murk et al., 1996) en vergelijkbare reportergeren gebaseerde testen voor de aanwezigheid voor dioxineachtige stoffen behoren tot de meest gevoelige en specifieke bioassays voor deze klasse van stoffen (Behnisch et al., 2001), met een gevoeligheid, die vergelijkbaar is met de meest geavanceerde chemische methoden (HRGC-HRMS). Dioxineachtige stoffen zijn persistente stoffen, die een overeenkomstig werkingsmechanisme hebben als 2,3,7,8,-TCDD (tetrachloordibenzodioxine), de meest toxische PCDD (polychloor dibenzodioxine), en die in het algemeen niet of nauwelijks gemetaboliseerd worden. Dioxineachtige stoffen kunnen zich ophopen in voedselketens en met name bij toppredatoren tot ernstige effecten (o.a. op de reproductie) leiden. Op subcellulair niveau vertonen alle dioxineachtige stoffen een hoge affiniteit met de Ah-receptor (aryl hydrocarbon) en leidt binding van het dioxine-receptor complex aan het DNA in de celkern tot een cascade van effecten, zoals inductie van specifieke eiwitten en enzymen (Cytochroom P450).

Tot de dioxineachtige stoffen in engere zin, zoals gedefinieerd door een werkgroep van de WHO (Ahlborg et al., 1994; Van den Berg et al., 1998), behoren onder andere toxische congenen van polychloordioxines (PCDD's), polychloordibenzofuranen (PCDF's), non- en mono-ortho gesubstitueerde polychloorbifenylen (PCB's), sommige polychloornaftalenen (PCN's), en sommige gebromeerde vlamvertragers, zoals polybroomdifenylethers (PBDE's) en polybroombifenylen (PBB's). Met de term dioxines, worden in het algemeen spraakgebruik, alleen de toxische congenen van PCDD's en PCDF's aangegeven.

In het kader van de normstelling voor dioxineachtige stoffen zijn door de WHO (UNEP, 2001; Van den Berg, 1998) z.g. toxiciteits equivalent factoren (WHO-TEF's) opgesteld voor een set van 7 PCDD's, 10 PCDF's en 12 coplanaire PCB's, die ook in de Europese regelgeving (EU Council Regulation No 2375/2001) voor dioxineachtige stoffen in voedingsmiddelen zijn overgenomen.

Daarnaast zijn er een aantal stoffen (zoals bijvoorbeeld een aantal PAK's en natuurlijke toxines) die op (sub)cellulair niveau hetzelfde mechanisme vertonen en tot dezelfde inductie van enzymactiviteit kunnen leiden, maar (o.a. door biotransformatie) niet tot

dezelfde persisterende effecten op hoger integratieniveaus leiden. Deze stoffen worden niet tot de dioxineachtige stoffen in engere zin gerekend, maar vaak aangeduid als “transient inducers” (Behnisch et al., 2001; Hilscherova et al., 2000).

In de literatuur zijn DR-CALUX specifieke relatieve effect potenties (REP) beschreven, waarbij EC50 waarden zijn uitgedrukt als fractie van de EC50 waarde van de meest actieve dioxine (2,3,7,8-TCDD). Dergelijke REP's zijn onder andere beschikbaar voor PCDD/F's en PCB's (Sanderson et al., 1998; Behnisch et al., 2001, 2002, 2003), PCN's (Behnisch et al., 2003), een aantal gebromeerde verbindingen (PBDD's, PBDF's, PBDE's; Behnisch et al. 2003), PAK's en gesubstitueerde PAK's (Machala et al., 2001). Deze DR-CALUX-REP waarden kunnen afwijken van de generieke WHO-TEF waarden en worden vooral gebruikt bij de beoordeling en de verklaring van de DR-CALUX respons uit chemische gegevens in TIE studies (Toxicity Identity Evaluation).

In opdracht van het RIKZ is door Aarts en Palmer (2002) een omvangrijke inventarisatie gemaakt van ca. 430 stoffen met aangetoonde of vermoedelijke AhR-affiniteit in de DR-CALUX test en andere *in-vitro* en *in-vivo* studies. De inventarisatie was bedoeld als database te gebruiken bij TIE studies aan sedimentmonsters met verhoogde DR-CALUX activiteit. De door Aarts en Palmer (2002) aangegeven mogelijke responsieve verbindingen omvatten onder meer: dioxines (n=30), dibenzofuranen (n=101), PCBs (n=111), gebromeerde vlamvertragers (n=8), PAKs en Azarenen (stikstof-PAKs) en metabolieten daarvan (n= 118). De overige stoffen (n=62) betroffen: flavonen en coumarines (plant-aardige stoffen, die een krachtige farmacologische werking vertonen), andere stikstofhoudende organische verbindingen, farmaceutische producten, voedingsadditieven, geurstoffen, natuurlijke pigmenten, antioxidanten en natuurlijke toxinen (Klamer et al., 2004). Het aandeel van de dioxineachtige stoffen in engere zin bedroeg ca. 60% (n=242). Het aandeel van PAKs en verwante verbindingen bedroeg ca. 25%.

De mate waarin bijdragen in de DR-CALUX respons verwacht kunnen worden van z.g. transient inducers (zoals b.v. PAK's) is sterk afhankelijk van de toegepaste voorbewerking en clean-up. In de clean-up worden zuur/base afbreekbare verbindingen en chemisch minder stabiele componenten verwijderd en blijven de stabiele dioxineachtige verbindingen over. De op dit moment beschikbare methoden gericht op dioxineachtige stoffen in engere zin zijn o.a. gebaseerd op: solid-phase chromatografie met aangezuurde silicakolommen (Murk et al., 1996, 1998; Houtman et al., 2004; Stronkhorst et al., 2002), 2) al dan niet in combinatie met NaOH/zilvernitraat/silica (multi-layer) kolommen (Leonards and van der Veen, 2001). Voor de chemische bepaling van PCDD/F's en andere dioxineachtigen wordt meestal een aanvullende fractionering over een koolstofkolom toegepast. De zure-silica kolom wordt het meest frequent toegepast in de screening van voedingsmiddelen, en is onderdeel van het CTT-protocol (Specie 07-E; RIKZ, 2004). De methode is ook toegepast bij de screening van effluenten en producten uit de chloorindustrie (Van Hattum et al., 2004). Bij validatiestudies in het kader van dat onderzoek (Lamoree et al., 2004), bleek dat de meeste PAK's effectief worden verwijderd, maar dat enkele lichtere PAK's met een relatief lage responsfactor niet volledig worden verwijderd (benzo(b)fluoranteen: 85-90%; fluoranteen: 80%).

In de door Leonards en van der Veen (2001) uitgevoerde validatiestudie voor de extractie gebruikt voor de DR-CALUX test is aangetoond dat bij de toepassing van het multi-layer systeem in principe geen bijdragen meer te verwachten zijn van PAK's en andere

transiente inducers. Deze methode is sinds 2004 opgenomen in het CTT-protocol voor de DR-CALUX test (Specie 07-E, RIKZ, 2004) naast de bestaande zure silica methode. Gezien de inzichten uit bovengenoemde validatiestudies wordt aanbevolen om bij de CTT bepalingen uitsluitend nog gebruik te maken van het multi-layer systeem.

Voor de chemische analyse van dioxines en dioxineachtige stoffen wordt meestal een combinatie van alle beschreven clean-up en fractioneringstechnieken gebruikt (Pluim et al., 1992). Daarnaast is in sommige studies (Klamer et al., 2004; Houtman et al., 2004), waarbij ook de oestrogene activiteit wordt beoordeeld, gewerkt met een beperkte voorzuivering gebaseerd op gelpermeatie chromatografie (GPC), waarbij ook bijdragen van PAK's zijn te verwachten. De met GPC clean-up gevonden respons (GPC-TEQ) in sediment uitgedrukt als TCDD-equivalente concentraties (TEQ), is in het algemeen aanzienlijk hoger (factor 50 - 2000) dan testen waarbij de zure silicakolom is toegepast (Si-TEQ) (Klamer et al. 2004).

2.2 Betrouwbaarheid en validiteit

De betrouwbaarheid en validiteit van de huidige in de CTT opgenomen testen en de zeeklittest zijn voorafgaand aan de invoering in 2004 op uitgebreide schaal getest en geoptimaliseerd (Kater et al., 2000, 2001; Spier et al., 2002; Postma et al., 2002) en er is een uitgebreid kwaliteitsprogramma doorlopen (Schipper, 1999; Stronkhorst et al., 2004; Besselink et al., 2004). Voor alle testen zijn protocollen beschreven in een handboek (Schipper en Stronkhorst, 1999), waarin de procedures voor de kwaliteitsborging in detail zijn beschreven. De protocollen zijn vanaf 1999 regelmatig geactualiseerd (RIKZ 2004, 2005a-c). Vrijwel alle rapportages over de optimalisering van de kwaliteit van de testen, de meest recente versies van de protocollen en overige relevante informatie zijn on-line beschikbaar via een website (www.zeeslib.nl).

Voor alle testen zijn voorafgaand aan de invoering in 2004 validatie en interlaboratoriumstudies uitgevoerd (Stronkhorst et al., 2004; Besselink et al., 2004) en zijn bij deelnemende laboratoria audits uitgevoerd (Te Nuyl, 2004). Sinds 2004 wordt voor de bioassays een gestandaardiseerde rapportage van resultaten, prestatiekenmerken en kwaliteitsborging toegepast. Bij de uiteindelijke invoering van de CTT in 2004 is de zeeklittest niet opgenomen, o.a. vanwege een onverklaard hoge respons voor een aantal sedimenten uit Noordelijke havens, die niet verklaard kon worden uit verschillen in gevoeligheid of de mate waarin aan randvoorwaarden en acceptatiecriteria was voldaan (Schipper, 2002). Een ander bekend probleem met de zeeklittest is het feit dat de voor de test benodigde leeftijd/grootte klasse niet altijd in het veld verzameld kan worden (Stronkhorst et al., 2004). In een uitgebreide evaluatie (Spier et al., 2002) is vastgesteld dat de zeeklittest verder voldoende robuust lijkt te zijn.

Voor beoordeling van de validiteit en gevoeligheid dienen voorafgaand aan de laboratoriumbepalingen controlesterfte met referentiesediment en de respons van een referentiestof te worden vastgesteld en vergeleken met vastgestelde criteria (TAC, test acceptatie criteria). Daarnaast zijn voor de verschillende testen aparte criteria en randvoorwaarden ontwikkeld om vals positieve testuitslagen zo goed mogelijk uit te kunnen sluiten, ten gevolge van bijvoorbeeld sulfide, ammonium, pH, sterk afwijkende saliniteit en lage zuurstofconcentraties in de *Corophium*-test (Postma et al. 2002; Schipper en Schout 2004). Voor de Microtox-SP test zijn acceptatie criteria opgesteld voor pH, zuurstof,

ammonium en sulfide en is een correctieprocedure (software programma) opgesteld voor de aanwezigheid van fijn zwevend materiaal (<63 µm). De verhoogde kans op vals positieve respons bij aanwezigheid van veel fijn zwevend materiaal is een bekend probleem in de Microtox-SP test (Ringwood et al., 1997; Stronkhorst et al., 2003; Davoren et al., 2005).

In tabel 2.6 is een korte samenvatting gegeven van de een aantal prestatiekenmerken van de verschillende testen uit validatiestudies en de resultaten van interlaboratorium studies. De variabiliteit is uitgedrukt als $2\sqrt{2} \cdot CV$ (variatiecoëfficiënt in %), conform richtlijnen van de Raad van Accreditatie (RVA) en ISO en IUPAC normen voor de uitdrukking van meetonzekerheid. Deze maat voor de herhaalbaarheid (spreiding binnen laboratorium) en de reproduceerbaarheid (spreiding tussen laboratoria) is te beschouwen als een benadering van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de te verwachten CV bij een minimaal aantal van 2 onafhankelijke replicaties om de meetonzekerheid vast te stellen.

Tabel 2.6 Samenvatting prestatiekenmerken van de biotesten afgeleid uit door het RIKZ georganiseerde validatie- en inter-laboratoriumstudies.

Test	Endpoint	Protocol	Gevoeligheid Detectie- limitiet ^a	Variabiliteit (als $2\sqrt{2} \cdot CV\%$) ^c		Bron ^e
				Herhaal- baarheid intra-lab ^b	Reproduceer- baarheid inter-lab studie	
Slijkgarnaal	Mort %	01	45 %	54 %	11–136 % (n=4)	[1]
					3–40 % (n=3) ^d	[1]
			13 % ^f	28 % ^f		[3]
Microtox- SP	TU	02	20 %	36 %	20 – 45 % (n=4)	[1]
DR-Calux	ng TEQ/ kg	07	0.2 ng TEQ/kg	30–68 %	3 – 28 % (n=6) 8 – 57 % (n=6; incl extractie)	[2]
Zeeklit	Mort %	03		21 %	8 – 141 % (n=4) 6 – 25 % (n=3) ^d	[1]

^a Bron: Handreiking CTT (Inspectie V&W, 2005), bepaald op basis van respons van referentie toxicant.

^b Lange termijn variabiliteit; bron: tabel 2 in Schipper en Schout (2004).

^c Uitgedrukt als $2\sqrt{2} \cdot CV$ conform definities van RVA (Raad van Accreditatie) en ISO richtlijnen voor uitdrukken van meetonzekerheid.

^d Bij niet in beschouwing nemen van laboratorium met sterk afwijkende waarden.

^e [1] = Stronkhorst et al. (2004); [2] = Besselink et al. (2004); [3] Burger et al. (2003).

^f Detectielimiet incl gemiddelde controle sterfte; korte termijn herhaalbaarheid (n=7).

In principe zou op basis van de inmiddels honderden uitgevoerde testen in de periode 1999-2005 een analyse gemaakt kunnen worden van de herhaalbaarheid zoals geregistreerd door de verschillende laboratoria. Echter, door de grote verschillen in rapportageformat in het verleden en de decentrale rapportagestructuur lijkt het niet waarschijnlijk, dat dit eenvoudig uitgevoerd zou kunnen worden.

In de huidige protocollen is alleen voor de *Corophium*-test (Specie-01) een aanvaardbaarheids criterium opgenomen voor de herhaalbaarheid van de gehele test ($CV < 20\%$ bij 5 replicaties). Voor de DR-CALUX test is alleen voor de fase waarin extracten worden getest (Specie-07) een criterium gedefinieerd ($CV < 15\%$) waarboven heranalyse is voorgeschreven. Voor de gehele procedure inclusief extractie (Specie-07-E) is geen criterium gedefinieerd. Voor de Mictotox-SP (Specie-02) zijn geen aanvaardbaarheids-criteria opgenomen voor de herhaalbaarheid. Het zou aanbeveling verdienen indien voor de Microtox-SP en DR-CALUX een acceptatiegrens voor de herhaalbaarheid van de gehele testprocedure met gerepliceerde baggerspeciemonsters wordt opgenomen inclusief voorschriften en richtlijnen voor de frequentie van de bepaling van de herhaalbaarheid. Daarnaast is het wenselijk indien in het standaardrapportage formulier voor de CTT biotesten een gestandaardiseerde en verplichte rapportage van de herhaalbaarheid wordt opgenomen voor alle testen.

De voorgestelde opzet van de set van CTT bioassays is in 2001 door een internationale audit-commissie (Long et al., 2001) overwegend positief beoordeeld. Diverse aanbevelingen zijn overgenomen in het huidige kwaliteitssysteem en een aantal voorgestelde onderwerpen zijn nader onderzocht.

Dit betrof ondermeer het optimaliseren van de testcondities in de slijkgarnaaltest, waarbij in veel gevallen testresultaten verworpen moeten worden vanwege te hoge ammoniumgehalten. Er is een nieuwe testopzet ontwikkeld (Burger et al., 2005) met een lagere sediment-zeewater verhouding (1:8.5 *versus* 1:3 in het huidige CTT-protocol) waarbij overschrijdingen van de acceptatiecriteria voor ammonium in de meeste gevallen vermeden kan worden. Op grond van vergelijkingsonderzoek met een aantal sedimentenmonsters waarbij ammonium toxiciteit waarschijnlijk geen rol speelt lijkt de nieuw voorgestelde test tot een gemiddeld lagere respons (ca. 20-40%) te leiden ten opzichte van het huidige protocol, maar de verschillen zijn door de herhaalbaarheid van de test niet significant (Peene et al., 2005; Burger et al., 2005). De concentraties van o.a. enkele zware metalen en PAK's in de waterfase waren vergelijkbaar in het bestaande en nieuw voorgestelde testsysteem. Daarnaast is de aanbeveling uitgewerkt om tot een chronische test voor de slijkgarnaal te komen met meer gevoelige en ecologisch relevante subletale end-points, zoals groei en reproductie (Kater, 2004). Voor de chronische slijkgarnaaltest (49 dagen) is inmiddels een concept protocol opgesteld (Kooman, 2005). Er zijn nog geen resultaten beschikbaar van vergelijkend onderzoek met veldsedimenten. In een door Aquasense uitgevoerde validatiestudie (Burger et al., 2003) voor de 10-dagen slijkgarnaaltest volgens het standaardprotocol (Specie-01) werd een korte termijn herhaalbaarheid vastgesteld van 28% ($n=7$) voor test-sediment uit de haven van Den Helder. Op basis van testen met de referentietoxicant (ammoniumchloride) in de periode 1999 t/m 2002 (LC_{50-72} uur: 134 ± 37 mg/L, $n=45$) werd een lange termijn herhaalbaarheid vastgesteld van 78%. In een recente interlaboratorium studie (9 laboratoria) met 4 verschillende soorten amphipoden (Casado-Martinez et al., 2006), waaronder de slijkgarnaal, werd voor de reproduceerbaarheid van 5 sedimentmonsters (exclusief het blanco-controle monster) een gemiddelde waarde gevonden van 23% (range 10% - 33% ; uitgedrukt als variatiecoëfficiënt). In een oudere studie van Bowmer (1993) met de slijkgarnaal en 'spiked sediments' werd een range van 39-52% gevonden voor de variatiecoëfficiënt.

Ten aanzien van de openstaande vragen rondom zeeklittest is een kritische evaluatie uitgevoerd (Spier et al., 2002), op grond waarvan geconcludeerd werd dat het testprotocol op zich voldoende robuust was, maar waarbij geen finale verklaring gevonden kon worden voor de verhoogde respons in sediment uit noordelijke havens. Om mogelijke ruimtelijke en seizoensafhankelijke variatie in gevoeligheid van in het veld verzamelde dieren te kunnen vermijden, zijn studies opgezet om te komen tot een gestandaardiseerde test met gekweekte dieren. In een recente tussenrapportage (Dubbeldam et al., 2005) zijn opmerkelijke resultaten beschreven van geslaagde experimenten om zeeklitten onder laboratoriumomstandigheden tot voortplanting aan te zetten. Op grond van verkennende experimenten met gekweekte zeeklitten blootgesteld aan veldsedimenten werden aanwijzingen gevonden voor een verbeterde herhaalbaarheid en een mogelijk lagere gevoeligheid ten opzichte van in het veld verzamelde dieren. Verdere studies met specifieke stoffen (o.a. TBT), kwaliteitsborging en het vaststellen van prestatiekenmerken lopen op dit moment nog.

Ten aanzien van de Microtox-SP test zijn aanvullende studies uitgevoerd gericht op de optimalisering van o.a. de herhaalbaarheid, zwevend-stofcorrectie, en doseringsaspecten (Keijzers en Van der Hoeven, 2004; Postma en Keijzers, 2005). Dit heeft o.m. geleid tot aanbevelingen voor de te kiezen verdunningsreeksen, die nog niet in de meest recente versie van het protocol (2005) zijn opgenomen. Uit de experimenten bleek verder, dat de op mariene (referentie)sedimenten gebaseerde correctieprocedure voor het aandeel van deeltjes met een korrelgrootte van $<63 \mu\text{m}$ (Stronkhorst et al. 2003b) en het ontwikkelde software programma EC50MSPt (Van der Hoeven, 2002) mogelijk niet voldoen voor sedimenten met een andere samenstelling en afkomstig uit bijvoorbeeld gebieden met lage saliniteit. In de correctieprocedure wordt geen informatie gebruikt over het aandeel van de lagere grootteklassen ($<16 \mu\text{m}$ of $<2 \mu\text{m}$), die waarschijnlijk een veel grotere invloed hebben op de respons. Tevens bleek de duur van het mengen van sediment en testmedium van invloed op de respons, en is de in het protocol opgenomen aanwijzing van minimaal 10 minuten roeren niet toereikend. Vooral bij anoxische sedimenten zullen bij het contact met zuurstof in deze tijdsduur de aan sulfiden gebonden metalen al gedeeltelijk gemobiliseerd kunnen worden. Uit desorptie-experimenten met organische verbindingen zoals PAK's, PCB's en chloorbenzenen is bekend, dat de als snel uitwisselbaar te beschouwen fractie van de aan het sediment gebonden stoffen gedurende de eerste 6 uur voor een deel gemobiliseerd kan worden (Cornelissen, 1999; Ten Hulscher 2005). Het is niet uit te sluiten en mogelijk waarschijnlijk, dat de voorgestelde tijdsduur voor sediment-water uitwisseling in het protocol (>30 minuten, waarvan >10 minuten voorafgaand aan de test en 20 minuten tijdens de test) een onderschatting levert van de biologisch beschikbare fractie. De in Postma en Keijzers (2005) beschreven experimenten gaven verder aanwijzingen, dat alleen blootstelling aan de waterfase een vergelijkbare respons opleverde ten opzicht van blootstelling aan het sediment-water systeem, en dat er blijkbaar geen sprake is van additionele opname ten gevolge van contact met het sediment. De experimenten zijn echter op te beperkte schaal uitgevoerd om definitieve conclusies te kunnen trekken. De in voornoemde studies waargenomen herhaalbaarheid (CV ca. 16-39%) ligt overigens in dezelfde orde van grootte van gegevens uit ringstudies met de standaard Microtox test (Ribo, 1997; Ribo et al., 2001; Farre et al., 2004) met afvalwater (gerapporteerde variatiecoëfficiënten voor herhaalbaarheid: ca. 10-38% en inter-lab reproduceerbaarheid: 15 – 30%). Een mogelijke oplossing - met beperkte addi-

tionele kosten - voor de problemen rondom de beperkte sediment-water uitwisseling en de correctie voor fijn sediment in de MSP test zou gevonden kunnen worden door naast de bestaande MSP test ook de standaard Microtox test uit te voeren met poriewater of met behulp van biomimetische technieken (extractie van sediment met b.v. Tenax of Siliconen rubber sheets) gedoseerde water monsters. Het in tandem toepassen van de MSP en de standaard Microtox test, beschreven in o.a. Burton et al. (2001) en Davoren et al. (2005), kan aanvullende informatie opleveren over mogelijke vals-positieve (fijn sediment correctie) of vals-negatieve respons (beperkte sediment-water uitwisseling) in de MSP test.

Bij de DR-CALUX test heeft optimalisering en nader onderzoek plaats gevonden van extractie- en clean-up methoden (Leonards en Van Veen, 2001; Klammer et al., 2004, 2005) en zijn toepassing van ASE-extractie, TBA ontzwaveling en clean-up over een multi-layerkolom opgenomen in het bestaande protocol (Specie-07-E; RIKZ, 2004). In het huidige protocol zijn (onder 4.4) zowel de multi-layerkolom als de zure silicakolom als clean-up toegestaan. Gezien de betere performance van de multi-layerkolom kan een keuze voor dit systeem aanbevolen worden.

De kwaliteitsbewaking van de feitelijke *in-vitro* test is identiek aan de maatregelen, die bij de screening van voedingsmiddelen met de DR-CALUX worden toegepast en op uitgebreide schaal zijn getest (Overmeire et al., 2001; Schoeters et al., 2004). De prestatiekenmerken zijn in overeenstemming met voorschriften in nationale en Europese regelgeving (EC, 2001) m.b.t. monitoring van dioxineachtige stoffen in voedingsmiddelen en andere producten. Vooral de kans op vals negatieve waarnemingen is gering en de gevoeligheid is vergelijkbaar met chemische screening van PCDD/F's en coplanaire PCB's, zoals bleek uit studies aan voedingsmiddelen (Schoeters et al., 2004), baggerspecie (Stronkhorst et al., 2002), en industriële effluënten en producten (Van Hattum et al., 2004). De kans op vals positieve waarnemingen, in de zin van inductie door niet dioxineachtige stoffen is bij toepassing van de multi-layerkolom als zeer gering te beschouwen.

Samenvattend kan gesteld worden dat in het kader van de ontwikkeling van de biotesten voor de CTT veel aandacht is besteed aan standaardisatie, optimalisering en kwaliteitsbewaking. De reproduceerbaarheid van de Microtox-SP en de 10-d *Corophium* test zijn vergelijkbaar met gegevens en inzichten voor vergelijkbare testen (EPA, 1996, ASTM 1997, Ribo et al., 2001; Nenzda 2002; Chapman et al., 2002). Voor de Microtox-SP blijven er vragen ten aanzien van de zwevend stof correctie en de blootstellingscondities tijdens de test en het is de vraag in hoeverre de herhaalbaarheid verder verbeterd kan worden. De MSP test lijkt op dit moment niet geschikt voor voorscreening van grote hoeveelheden monsters. Aanbevolen wordt om te overwegen of additionele bepaling met de standaard Microtox test van de toxiciteit met de poriewater of biomimetisch gedoseerde systemen een zinvolle aanvulling kan vormen. Ten aanzien van de 10-d *Corophium* test en de problematiek van vals-positieve respons ten gevolge van ammoniumtoxiciteit lijkt de voorgestelde aanpassing van het bestaande protocol een groot deel van de problemen weg te nemen, maar is er nog onvoldoende ervaring om definitieve conclusies te trekken.

De prestatiekenmerken van de DR-CALUX test voldoen wat betreft het *in-vitro* gedeelte aan internationale eisen. De toegestane opties in het protocol bij de clean-up van extrac-

ten dienen verder ingeperkt te worden. Voor de nieuw voorgestelde testen (de chronische *Corophium* test en de *Echinocardium* test met gekweekte dieren) is nog onvoldoende materiaal beschikbaar om een beoordeling te kunnen geven. Verder wordt geadviseerd om voor alle testen specifieke richtlijnen op te nemen in de protocollen voor de bewaking en rapportage van de herhaalbaarheid.

2.3 Mengseltoxiciteit

Een belangrijk argument voor de invoering van bioassays was dat hiermee in indruk verkregen kon worden van mogelijke risico's van blootstelling aan mengsels van stoffen en onbekende interacties tussen deze stoffen. Vooral de standaard Microtox test en voorlopers hiervan worden al meer dan 20 jaar toegepast (Hermens et al. 1985, Chen en Chiou 1995; Altenberger et al. 2000, Choi et al. 2004). Veel van de huidige inzichten en theorievorming rondom mengseltoxiciteit (Warne, 2003) zijn gebaseerd op experimenten met dit systeem. Er zijn geen internationale publicaties gevonden, waarbij de in veldmonsters gemeten respons van *Vibrio fischeri* (noch in de standaard Microtox test of in de MSP test) op basis van een mengseltoxiciteitsmodel verklaard kon worden uit chemische blootstellingsgegevens. Gezien de onduidelijkheden rondom de biologische beschikbaarheid van sedimentgebonden stoffen in de Microtox-SP test zijn aan een dergelijk berekening grote onzekerheden verbonden.

De DR-CALUX test is uitermate gevoelig voor verschillen in samenstelling van complexe mengsels van dioxineachtige stoffen en wordt om die reden al enkele jaren als voorscreening voor de monitoring van dioxines in voedingsmiddelen gebruikt. In tal van *in-vivo* en *in-vitro* testsystemen is vastgesteld dat in de meeste gevallen de verschillende dioxineachtige stoffen een additieve werking hebben (Van den Berg et al., 1998) en dat de totale activiteit van mengsels beschreven kan worden met generieke TEF waarden (toxicity equivalent factor) of test-specifieke REP waarden (relative effect potency). Tussen op basis van generieke TEF waarden en (met GC-MS bepaalde) concentraties van PCDD/F's en coplanaire PCB's berekende totale equivalente TCDD concentraties (GCMS-TEQ), en de gemeten respons in de DR-CALUX test (CALUX-TEQ) zijn zeer goede correlaties gevonden in studies aan deze stoffen in otters (Murk et al., 1996), voedingsmiddelen (Schoeters et al., 2004), en industriële (lucht)emissies (Van Hattum et al., 2004). In enkele studies met baggerspecie kon op deze wijze een deel van de activiteit worden toegeschreven aan aanwezige PCDD's, PCDF's en PCB's. In de studie met sediment uit het Rijnmondgebied van Stronkhorst et al. (2002) werd gemiddeld 50% van de activiteit toegeschreven aan PCDD/F's en ca. 6% aan coplanaire PCB's. In een studie in het Zeehavenkanaal (Delfzijl) kon door Klamer et al. (2004) meer dan 40% van de waargenomen DR-CALUX respons worden toegeschreven aan deze stoffen. De niet verklaarde respons (ca. 40-60%) wordt meestal toegeschreven aan bijdragen van niet gemeten dioxineachtige stoffen en niet bekende interacties.

Met betrekking tot de gevoeligheid van *Corophium* en *Echinocardium* voor mengsel effecten geven de studies van Brils en al. (2002) aan dat deze soorten in principe in staat zijn de grote verschillen in toxiciteit van complexe oliemengsels weer te geven. In een gerelateerde studie zijn met modelberekeningen en QSAR's, gebaseerd op de door Verbruggen (1999) voorgestelde benadering, schattingen gemaakt van de te verwachten interne concentraties van oliecomponenten in de organismen en kon aannemelijk

gemaakt worden dat de waargenomen respons in de gebruikte testen (slijkgarnaal, zee-klit, Microtox-SP) toegeschreven zouden kunnen worden aan een verondersteld narcotisch werkingsmodel (Van Hattum et al., 2000).

2.4 Vangnetfunctie

Ten aanzien van de vraag in hoeverre de huidige combinatie van in de CTT opgenomen testen en genoemde kandidaat-testen als een vangnet zouden kunnen fungeren voor de aanwezigheid van onbekende stoffen of mengsels, is het duidelijk dat de huidige acute testen onvoldoende inzicht zullen geven in o.a.:

- Chronische en subletale effecten van langzaam accumulerende stoffen, zoals van toepassing voor de meeste stoffen met een PBT-karakter. Alleen voor PBT stoffen met een dioxineachtige werking is de DR-CALUX test als voldoende gevoelig te beschouwen;
- Effecten van specifiek werkende stoffen op niet in de testbatterij opgenomen taxa, zoals bijvoorbeeld effecten van herbiciden op algen;
- Niet in de testen opgenomen werkingsmechanismen: b.v. hormonale verstoring, mutageniteit, carcinogeniteit, neurotoxiciteit, fotosyntheseremming;
- Effecten op hogere integratieniveaus (populatie-, en ecosysteemniveau);
- Indirecte effecten van accumulerende stoffen, zoals doorvergiftiging (accumulatie in voedselketens en met effecten op een hoger trofisch niveau) en effecten op populatie of ecosysteemniveau.

Voor de beoordeling voor de geschiktheid als vangnet voor een signalerende functie spelen verder de eerder genoemde criteria (p.9) een rol, die deels ook overlappen met criteria voor de selectie van testen voor ecologische risicobeoordeling.

Het probleem van de selectie van de juiste soorten en testparameters speelt in diverse nationale en internationale monitoringprogramma's (Chapman et al., 2002; Nendza, 2000; Peters et al., 2002; Munns et al., 2002). In de Amerikaanse benadering, waar al sinds de zeventiger jaren wordt gewerkt met biologische beoordeling, zijn in een getrapte beoordeling (TIER I-IV) naast toxiciteitstesten ook bioaccumulatiestesten opgenomen. Er zijn geen vaste biotesten voorgeschreven, de keuze is mede afhankelijk van het ontvangende ecosysteem (Munns et al., 2002). Voor een groot aantal mogelijk geschikte testsoorten (kreeftachtigen, tweekleppigen, anneliden, stekelhuidigen en vissen) zijn gestandaardiseerde testprotocollen beschikbaar (EPA and US-ACE, 1998). Aanbevolen criteria voor de selectie van testsoorten zijn o.a.: gevoeligheid en levensstadium van de soort in relatie tot locatiespecifieke probleemstoffen, fylogenetische verwantschap met aanwezige soorten op de ontvangende locatie, ecologische relevantie van de testparameters, vertegenwoordiging van verschillende trofische niveaus, fylo en functionele groepen (filter-, deposit feeders). Amphipoden (waartoe o.a. de slijkgarnaal behoort) worden in het algemeen als ecologisch relevant en voldoende gevoelig beoordeeld (Nendza, 2000; Chapman et al., 2002; Peters et al., 2002).

Peters et al. (2002) beschrijven de motivering en opzet van lopende evaluatie- en validatiestudies van sediment biotesten in Duitsland, waar is gekozen voor een combinatie van gestandaardiseerde testen van het poriewater met *Vibrio fischeri* en een algentest (*Phaeodactylum tricornutum*; 3-d groeiremming/ reproductie) en van het sediment met

Corophium volutator (10-d, mortaliteit, ingraafgedrag). In een recente Ierse studie zijn een aantal mogelijke testen vergeleken door Davoren et al. (2005) en zijn een algentest (*Skeletonema costatum*) en Microtox test met poriewater en de Microtox-SP test met sediment voorgesteld als kandidaat testen voor sedimentbeoordeling.

In een door De Zwart en Sterkenburg (2002) beschreven studie werden geconcentreerde extracten van oppervlaktewatermonsters gescreend met vijf verschillende bioassays (algentest, standaard Microtox test, en 3 testen met kreeftachtigen: *Daphnia* IC-, Rotox- en Thamnotox-test). Op basis van de waargenomen toxiciteitsprofielen werden locatie-specifieke soortgevoelighedsverdelingen (SSD's) berekend, waarmee een schatting gemaakt werd van het % soorten (PAF, potentially affected fraction) dat mogelijk blootgesteld was aan concentraties waarbij effecten niet uitgesloten konden worden (boven de NOEC). Op grond van een evaluatie van literatuurgegevens werd voor de omrekening van acute EC50 waarden naar chronische NOEC waarden gewerkt met een omrekeningsfactor van 10. De respons van verschillende testen vertoonde een zeer geringe correlatie, duidend op locatieafhankelijke verschillen in de respons van de verschillende testen. Over het geheel bleek de Microtox test het meest responsief.

In een recent afgerond onderzoek naar de aanwezigheid van gechloreerde PBT stoffen in emissies en producten van bedrijven uit de chloorketen is voor de screening van afvalwater (Lamoree et al., 2004; Gerritsen et al., 2004) gewerkt met een test batterij met 2 *in-vivo* testen (22-h chronische Microtox test; 8-d early-life stage zebravis test) en 3 *in-vitro* testen voor de detectie van stoffen met een dioxineachtig werkingsmechanisme (DR-CALUX; EROD inductie in carp-hepatocyt test) en met een (anti)oestrogene werking (vitellogenine inductie in carp-hepatocyt test). Door de combinatie van *in-vitro* en *in-vivo* testen kon worden voldaan aan uiteenlopende eisen ten aanzien van gevoeligheid, selectiviteit en relevantie voor verdere risicobeoordeling. Een van de overwegingen bij de keuze voor de zebravis-ELS test was, dat hiermee deels ook bioaccumulerende stoffen konden worden afgedekt, zonder aparte kostbare bioaccumulatie-experimenten uit te hoeven voeren.

Vanuit het oogpunt van het samenstellen van een meer omvattend vangnet en kosten-effectiviteit zou uitbreiding met (een set van) werkings specifieke *in-vitro* assays en het eventueel opstellen van toxiciteitsprofielen een optie kunnen zijn. In de studies van Houtman et al. (2002, 2004), Hamers et al. (2000) en Legler (2001) zijn voorbeelden gegeven hoe deze assays ingezet kunnen worden voor screening van milieumonsters of voor TIE onderzoek gebruikt kunnen worden. In een recent afgerond Europees project naar voorkomen en risico's van gebromeerde vlamvertragers (FIRE project, 5^e kaderprogramma) zijn een groot aantal vlamvertragers gescreend op verschillende soorten van hormoonverstoring (agonist/antagonist m.b.t. androgeen, progestrogeen, oestrogeen, schildklierhormoon). Op grond van multivariate analyse konden de stoffen in verschillende groepen met overeenkomstige profielen van hormoonverstoring worden ingedeeld (Hamers et al., in prep). Op de middellange termijn valt ook te verwachten dat uit diverse nu lopende onderzoeksprogramma's op het gebied van Ecogenomics en Toxicogenomics technieken (micro arrays) beschikbaar zullen komen voor de screening en beoordeling van de kwaliteit van milieumonsters op basis van gen-expressieprofielen voor een groot aantal soorten, stoffen en andere stressfactoren.

Afgezet tegen de inspanningen rondom het verbeteren van de robuustheid en validiteit van de huidige CTT testen, kan de vraag gesteld worden of het vanuit het verbeteren van de vangnetfunctie voor signalering niet wenselijk zou zijn om uitbreidingen te overwegen naar andere trofische niveaus (b.v. algen of vis-embryo test) of relevante mechanisme gebaseerde *in-vitro* testen voor hormonale verstoring.

2.5 Conclusies signalering en vangnet

Zowel voor de standaard Microtox test en de DR-CALUX test zijn voor een grote hoeveelheid stoffen gegevens voorhanden en is uit vergelijkend onderzoek gebleken dat beide testen als gevoelig beschouwd kunnen worden voor de acute effecten van een breed spectrum aan stoffen (Microtox), dan wel voor specifieke target stoffen met een dioxineachtig werkingsmechanisme (DR-CALUX). Voor de Microtox-SP test zijn nauwelijks stofspecifieke gegevens uit spiked-sediment tests beschikbaar om aannemelijk te kunnen maken dat dit ook voor de MSP test geldt.

Voor de 10-d *Corophium* test en de test met de zeeklit (*Echinocardium*) zijn slechts beperkt stofspecifieke gegevens beschikbaar uit toxiciteitstesten. Op grond van vergelijkend onderzoek met veldsedimenten lijkt het voor de *Corophium*-test aannemelijk, dat ook deze soort als voldoende gevoelig beschouwd mag worden. Voor de zeeklit kan dit niet worden vastgesteld of onderbouwd. Voor alle *in-vivo* testen in de CTT geldt, dat de beschikbare informatie overwegend betrekking heeft op acute toxiciteit, en dat de informatie over chronische toxiciteit voor deze soorten zeer beperkt is of ontbreekt.

Voor de standaard Microtox test (met watermonsters) en DR-CALUX test zijn meerdere mengseltoxiciteitsstudies uitgevoerd, op grond waarvan duidelijk is dat deze testen zeer gevoelig kunnen zijn voor effecten van complexe mengsels. Voor de MSP, *Corophium* en *Echinocardium* zijn de beschikbare gegevens te beperkt om conclusies te kunnen trekken.

Wat betreft de prestatiekenmerken van de huidige CTT-biotesten lijkt op dit moment alleen de DR-CALUX voldoende gestandaardiseerd en gevalideerd om een volwaardige signalerende en vangnetfunctie voor de aanwezigheid van dioxineachtige stoffen te kunnen vervullen. Indien ten aanzien van extractie en opzuivering gekozen wordt in het protocol (Specie-07E) voor een systeem, waarbij alleen dioxineachtige stoffen (in engere zin) overblijven (clean-up met multi-layerkolom), zou deze test mogelijk ook voor diskwalificerende doeleinden in aanmerking kunnen komen.

Voor de overige CTT testen (Microtox-SP, 10-d *Corophium*) blijven er ten aanzien van signalerende- en vangnetfunctie onzekerheden ten aanzien van de kans op vals-positieve en negatieve uitslagen. Voor de nieuw voorgestelde testen (de chronische *Corophium* test en de *Echinocardium* test met gekweekte dieren) is nog onvoldoende materiaal beschikbaar om een beoordeling te kunnen geven van de gevoeligheid en robuustheid.

Met uitzondering van de DR-CALUX test kan geen met literatuurgegevens onderbouwde beoordeling gegeven worden van de gevoeligheid voor onbekende of niet-gemeten stoffen en/of mengselinteracties en kan niet worden onderbouwd dat de huidige selectie geschikt zou zijn als een allesomvattend vangnet. De signalerende functie van de MSP en de 10-d *Corophium* test is beperkt met betrekking tot: subletale effecten, chronische effecten, risico's van doorvergiftiging, effecten bij gevoelige levensstadia, een aantal

relevante werkingsmechanismen, waaronder hormoonverstoring, en effecten op hogere integratieniveaus (populatie, ecosysteem niveau). Ten aanzien van voor het beleid relevante stofgroepen, lijkt ook de signalerende functie voor PBT, vPvB en CMR stoffen beperkt.

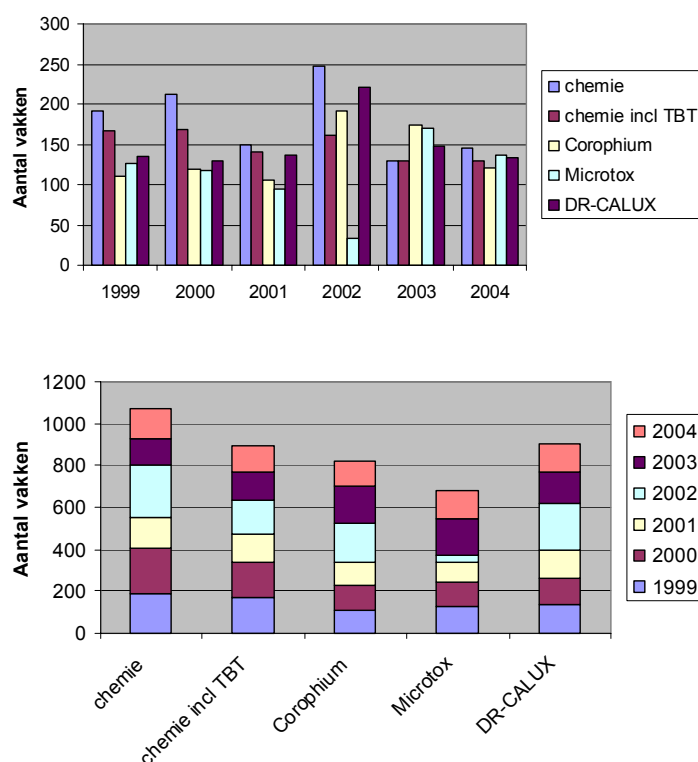
Samenvattend kan gesteld worden dat met de huidige biotesten in de CTT een beperkte signalerende functie wordt vervuld maar dat de drie testen niet gezien kunnen worden als een dekkend vangnet voor onbekende stoffen en mengsels. Afgezet tegen de inspanningen gericht op het verder verbeteren en verfijnen van de bestaande testen, zou overwogen kunnen om verbetering van de vangnetfunctie te realiseren door uitbreiding met additionele soorten (algen, vis-embryo) en werkingmechanismen (hormonale verstoring).

3. Verkennende berekeningen t.a.v. diskwalificatie

3.1 Database gegevens 1999-2004

Op grond van door het RIKZ aangeleverde monitoringsgegevens van regionale beheerders en vergunningverlenende instanties, zijn de in de Speciebos database opgenomen gegevens voor de periode 1999 t/m-2002 opgeschoond en aangevuld met de gegevens uit 2003 en 2004. De beschikbare gegevens uit 2005 zullen in een later stadium worden ingevoegd. Onderstaand een beperkte analyse op basis van de nog niet complete dataset.

Eerdere berekeningen (Stronkhorst, 2003; Schipper en Schout, 2004) waren tot nu toe gebaseerd op een beperkte dataset waarvoor zowel chemie- als bioassaygegevens beschikbaar waren (gegevens periode 1999-2002; n=279 havenvakken). De aangevulde database met gegevens voor 1999 t/m 2004 omvat nu 1085 havenvakken waarvoor chemiegegevens voorhanden zijn. Voor 906 havenvakken zijn ook gegevens m.b.t. TBT beschikbaar (en kan de CTT beoordeling uitgevoerd worden). Het aantal havenvakken waarvoor bioassay gegevens beschikbaar zijn (waarbij werd voldaan aan acceptatie criteria) bedraagt: 822 voor *Corophium*, 681 voor Microtox-SP, 903 voor DR-CALUX, en 267 voor *Echinocardium* (alleen bepaald in 1999 en 2000). Daar TBT en de afzonderlijke bioassays niet altijd in overeenkomstige vakken voorkomen, is de dataset met gepaarde chemische en biologische waarnemingen (1 of meer biotesten) beperkt tot 572-600 havenvakken (afhankelijk van de parameters).

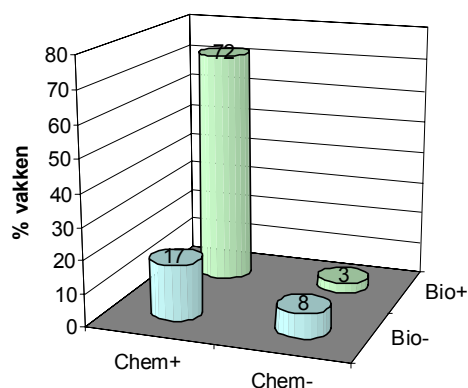


Figuur 3.1 Aantallen havenvakken waarvoor gegevens zijn opgenomen in de database voor de periode 1999 t/m 2004.

In figuur 3.1 de verdeling van de verschillende parameters over de verschillende jaren weergegeven. Opvallend is dat in 2002 Microtox sterk ondervertegenwoordigd is (o.a. vanwege het hoge aantal vakken waarin niet werd voldaan aan de test acceptatie criteria (TAC's). Daarnaast is de Microtox-SP en *Corophium* ook in de periode 1999-2002 ondervertegenwoordigd ten opzichte van de DR-CALUX ten gevolge van het niet voldoen aan de TAC's. Een overzicht van de frequentieverdeling van de respons van de verschillende bioassays is opgenomen in appendix II.

3.2 Beoordeling op basis van biotesten

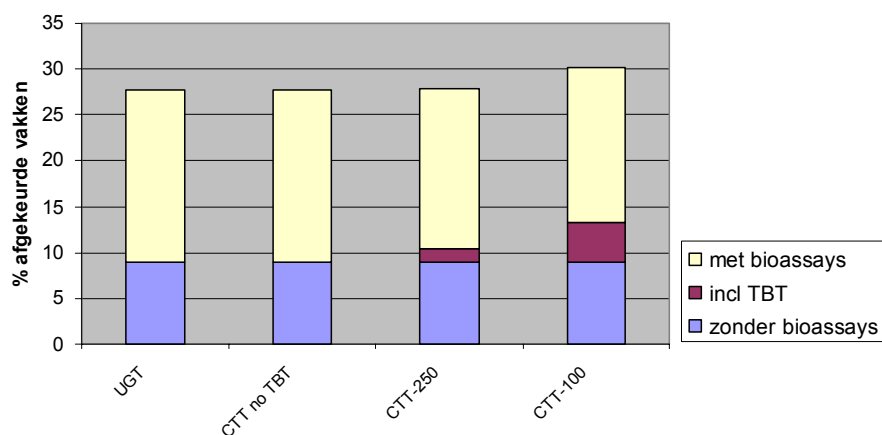
In figuur 3.2 zijn de overeenkomsten en verschillen tussen de chemische en biologische beoordeling weergegeven, bij toepassing van de in de CTT geformuleerde criteria en een toetswaarde voor TBT van 250 µg Sn /kg dry wt (hier als CTT-250 toetsscenario aangegeven). In 80% van de gevallen vindt overeenkomstige toewijzing plaats: 72% wordt zowel op grond van chemie en biotesten toegelaten (aangegeven als resp. Chemie+ en Bio+) en 8% wordt in beide gevallen afgewezen (aangegeven als Chemie- en Bio-). In 20% van de gevallen is de toewijzing verschillend (17% met Chemie+ en Bio-; 3% met Chemie- en Bio+).



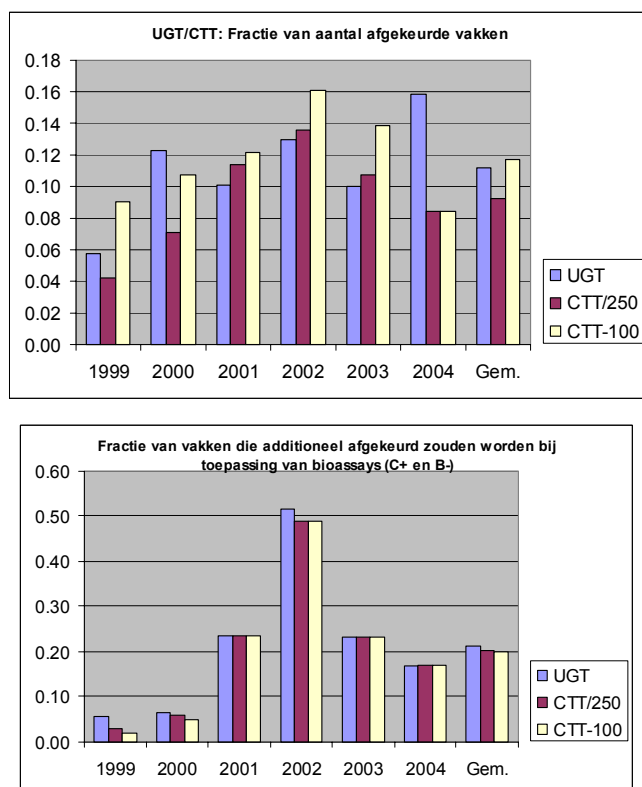
Figuur 3.2 Overeenkomst en verschillen van toewijzing (% goedgekeurde of afgekeurde havenvakken) op basis van chemische criteria (CTT-250) en bioassays (n=572). Toelichting: zie tekst.

In figuur 3.3 is aangegeven dat bij het diskwalificerend laten zijn van de bioassays onder de huidige CTT beoordeling (CTT-250), het percentage afgekeurde vakken zal stijgen van gemiddeld 11% naar 28% (stijging 17%). Tevens is in figuur 3.4 aangegeven wat de consequenties zijn van verschillende toetsingsscenario's: UGT (de tot 2004 van kracht zijnde uniforme gehalten toets) en de CTT zonder met verschillende normen voor TBT (CTT no TBT, CTT-250, CTT-100).

Bij het overzicht van de toename van de afgekeurde fracties (van het aantal per jaar (figuur 3.4) valt op dat met name in 2002 een sterke toename plaatsvindt; dit wordt veroorzaakt door het geringe aantal waarnemingen voor Microtox-SP in vakken waarvoor ook chemie-gegevens beschikbaar zijn in dat jaar (n=33).



Figuur 3.3 Toename van de fractie afgekeurde havenvakken bij het diskwalificerend laten zijn van de bioassays onder verschillende toetsingsregimes (voor 572 havenvakken; periode 1999 t/m 2004). Tevens is het aandeel van TBT als afkeuringsgrond aangegeven en is ter vergelijking de chemische beoordeling conform de UGT aangegeven.



Figuur 3.4 Toename van de fractie afgekeurde havenvakken bij het diskwalificerend laten zijn van de bioassays, uitgesplitst naar jaar en verschillende toetsingsregimes.

3.3 Samenhang met chemische parameters en omgevingsvariabelen

Een eerste voorlopige analyse van mogelijke enkelvoudige correlaties (non-parametrische Spearman's Rho test, zie appendix III) leverde een beperkt aantal zwakke maar significante correlaties tussen de bioassay respons en chemische parameters / sedimentkarakteristieken (organisch stof, korrelgrootte) voor de Microtox-SP en de DR-CALUX, waarvan een beperkt deel met een R groter dan 0.3 of kleiner dan -0.3. Voor de *Corophium* test werden geen significante correlaties gevonden met een R groter dan 0.2 en kleiner dan -0.2. De gevonden enkelvoudige correlaties voor Microtox en DR-CALUX hebben zonder aanvullende analyse van covariantie tussen de verschillende parameters geen betekenis en lijken vooral samen te hangen met de totale hoeveelheid verontreiniging, die ook in sterke mate samenhangt met de korrelgrootteverdeling en het organisch koolstof gehalte.

Parameters met correlatiecoëfficiënt (Spearman's Rho) met $R < -0.3$ of $R > 0.3$:

Microtox-SP: $<2\mu\text{m}$, $<63\mu\text{m}$, Org-C, As, HCB, Som-DDT, en TBT

DR-CALUX: $<2\mu\text{m}$, $<63\mu\text{m}$, Org. stof, Olie, PAK's, Som-DDT, As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn,

Toepassing van lineaire multiple regressie op basis van niet getransformeerde gegevens leverde een lage verklaarde variantie voor de voorspelling van de Microtox-SP respons uit chemische parameters ($R^2 = 0.38$; $N=277$) met enkele significante regressiecoëfficiënten (Cd, Cr, Hg, Ni, Olie, TBT en fractie $<2\mu\text{m}$), die in een aantal gevallen negatief waren (Cd, Cr,) en waarvoor geen zinvolle interpretatie voor gegeven kan worden. Voor de *Corophium* respons werd geen significante regressie gevonden. Bij de DR-CALUX respons werd een lage verklaarde variantie gevonden ($R^2 = 0.22$, $N=227$) met een significante regressiecoëfficiënt voor: organisch koolstof, minerale olie, en de fractie $<63\mu\text{m}$.

Eerder is door Stronkhorst et al. (2003) met partial least square (PLS)-regressie) op basis van een deel van de data (1999-2002 gegevens) voor Microtox-SP een verband gevonden met de totale gehalten aan verontreinigingen. De hierboven aangegeven observaties passen in dit beeld.

De bevinding dat alleen in de gevallen van extreem hoge of lage verontreinigingsgraad een overeenkomst wordt gevonden tussen chemische en biologische beoordeling is in lijn met bevindingen uit Noord-Amerikaanse studies (Chapman et al., 2002). Het ontbreken van correlaties en covariatie in het middengebied is een sterke aanwijzing dat de chemische en biologische beoordeling complementair is. Ook in de door Schipper en Schout (2004) beschreven analyse (PCA en clusteranalyse) werd geconstateerd dat er nauwelijks verbanden waren tussen chemische gehalten en de biologische respons.

Referenties

- Aarts, J.M.M.J.G. & Palmer, R. (2002). *Established and deduced aromatic hydrocarbon (Ah) re-ceptor (AhR) agonists and their relative potency*. Wageningen University, Department of Agrotechnology and Food Sciences, Wageningen.
- Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brouwer, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Waern, F., Younes, M. & Yrjan-heikki, E. (1994). Toxic Equivalency Factors for Dioxin Like PCBs - Report on a WHO ECEH and IPCS Consultation. December 1993. *Chemosphere*, 28, 1049-1067.
- Åkerman, J., Klammer, H., Schipper, C., Bakker, J., Bellert, B. & Pijnenburg, J. (2004). *Stoffen in de Noordzee en de Nederlandse Kustzone in 2003 : ftalaten, vlamvertragers, organotin- en geperfluoreerde verbindingen en effectgerichte metingen*. RIKZ/2004.040.
- Altenberger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M. & Scholze, M. (2000). Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2341-2347.
- Aquasense (2002). *Evaluatie Bioassay Zeeklit. Chronische evaluatie van onderzoek en monitoring met Echinocardium cordatum*. In opdracht van: RIKZ Veldstation Jacobahaven. Rapportnummer 2002.2310. Aquasense / Grontmij, Amsterdam.
- ASTM. (1997a). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E1706-95b. *ASTM Annual Book of Standards*, Vol. 11.05, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1138-1220.
- Bat, L. & Raffaelli, D. (1998). Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226, 217-239.
- Bat, L. (1997). Studies on the Uptake of Copper, Zinc and Cadmium by the Amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in the Laboratory. *Turk.J.Mar.Sci.*, 3(2), 93-109.
- Behnisch, P.A., Hosoe, K. & Sakai, S.I. (2001). Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology. *Environment International*, 27, 413-439.
- Behnisch, P.A., Hosoe, K. & Sakai, S.I. (2003). Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds. *Environment International*, 29, 861-877.
- Benisch, P. et al. (2002). Screening of dioxin-like toxicity equivalents for various matrices with wildtype and recombinant rat hepatoma H4IIE Cells. *Toxicological Sciences*, 69, 125-130.
- Berbee, R.P.M., Kalf, D., Duijn, P. van & Beek, M. (2004). 'Vergeten' stoffen in R.W.Z.I.-effluenten in het Maasstroomgebied. RIZA rapport 2004.018.
- Berg, M. van den, Birnbaum, L., Bosveld, B.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M. & Giesy, J. P. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs and PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, 106, 775-792.
- Besselink, H.T., Schipper, C., Klammer, H., Leonards, P., Verhaar, H., Felzel, E., Murk, A.J., Thain, J., Hosoe, K., Schoeters, G., Legler, J. & Brouwer, B. (2004). Intra- and interlaboratory calibration of the DR-CALUX bioassay for the analysis of dioxins and dioxin-like chemicals in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2781-2789.
- Bowmer, C.T. (1993). *Method for the assessment of acute toxicity of contaminated sediment using the burrowing heart urchin Echinocardium cordatum*. Test guideline for OSPAR sedi-

- ment reworker ring test*. Report IMW R 93/317. Organization of Applied Scientific Research TNO, Delft, the Netherlands.
- Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L. & Scholten, M.C.T. (2002). Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2242-2251.
- Brown, R.J., Conradi, M. & Depledge, M.H. (1999). Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). *Sci.Total Environ.*, 233, 77-88.
- Bryant, V., McLusky, D.S., Roddie, K. & Newbery, D.M. (1984). Effect of temperature and salinity on the toxicity of chromium to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Nereis*). *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 20(1-2), 137-149.
- Bryant, V., Newbery, D.M., McLusky D.S. & Campbell, R. (1985b). Effect of temperature and salinity on the toxicity of arsenic to three estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 24(1/2), 129-137.
- Bryant, V., Newbery, D.M., McLusky, D.S. & Campbell, R. (1985a). Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to two estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*). *Mar.Ecol.Prog.Ser.*, 24(1-2), 139-153.
- Burger, E.M., Dubbeldam, M. & Peene, E. (2003). *Validatierapport Corophium volutator - uitgevoerd volgens RIKZ/Specie-01*. Aquasense – Grontmij, Amsterdam.
- Burger, E.M., Kooman, H. & Dubbeldam, M. (2005). *Een ammoniumbestendige test voor Corophium volutator volgens RIKZ/Specie-01 - Toepasbaarheid en betrouwbaarheid van een aangepast testsysteem*. Rapportnr. 2602. Aquasense – Grontmij, Amsterdam.
- Casada-Martinez, M.C., Beiras, R., Bezunce, M.J., Gonzalez-Castromil, M.A., Marin-Guirao, L., Postma, J.F., Riba, I. & DelValls, T. (2006). Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. *Ciencias Marinas*, 32, 149-157.
- Chapman, P.M., Ho, K.T., Munns, W.R., Solomon, K. & Weinstein M.P. et al. (2002). Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Poll. Bull.*, 44, 271-278.
- Chen C.Y. & Chiou Y.S. (1995). Toxicity of binary-mixtures of organic-chemicals. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 97-106.
- Choi, K.H., Sweet, L.I., Meier, P.G. & Kim, P.G. (2004). Aquatic toxicity of four alkylphenols (3-tert-butylphenol, 2-isopropylphenol, 3-isopropylphenol, and 4-isopropylphenol) and their binary mixtures to microbes, invertebrates, and fish. *Environmental Toxicology*, 19, 45-50.
- Ciarelli, S., Straalen, N.M. van, Klap, V.A. & Wezel, A.P. van (1999). Effects of sediment bio-turbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* in fluoranthene resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environ.Toxicol.Chem.*, 18(2), 318-328.
- Ciarelli, S., Vonck, W.A.P.M. & Straalen, N.M. van (1997). Reproducibility of spiked-sediment bioassays using the marine benthic amphipod, *Corophium volutator*. *Marine Environmental Research*, 43, 329-343.
- Ciarelli, S., Vonck, W.A.P.M., Straalen, N.M. van & Stronkhorst, J. (1998). Ecotoxicity assessment of contaminated dredged material with the marine amphipod *Corophium volutator*. *Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 350-356.
- Conradi, M. & Depledge, M.H. (1998). Population responses of the marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) to copper. *Aquat.Toxicol.*, 44(1/2), 31-45.
- Crommentuijn, T., Kalf, D.F., Posthumus, R., Polder, M.D. & Plassche, E.J. van de (1997). *Maximum permissible concentrations and negligible concentrations for pesticides*. RIVM-report no. 601501 002. RIVM, Bilthoven.

- CSC (2003). *Ecotox – ecotoxicology database system - Acquire coding guidelines*. Prepared for U.S. EPA. Computer Science Corporation, Duluth (MN), USA.
- Da Silva Nunes-Halldorson, V. & Duran, N.L. (2003). Bioluminescent bacterial LUX genes as environmental sensors. *Brazilian J. of Microbiol.*, 34, 91-96.
- Daan, R., Lewis, M.E. & Mulder, M. (1990). *Biological effects of discharged oil-contaminated drill cuttings in the North Sea*. Rapport NIOZ 1990-5, Texel.
- Davoren, M., Shuilleabhain, S.N., O'Halloran, J., Hartl, M.G.J., Sheehan D., O'Brien, N.M., Pelt van, F.N.A.M. & Mothersill, C. (2005). A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 14, 741–755.
- Deneer, J.W., Leeuwen, C.J. van, Seinen, W., Mass-Diepeveen, J.L. & Hermens, J.L.M. (1988). A QSAR study of the toxicity of nitrobenzene derivatives towards *Daphnia magna*, *C. chlorella pyrenoidosa* and *P. photobacterium phosphoreum*. In Deneer, J. (1988). *The Toxicity of Aquatic Pollutants: QSARs and Mixture Toxicity Studies*. (pp.29-46). Ph.D. Thesis, University of Utrecht.
- Depledge, M.H. & Billingham, Z. (1999). Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12), 32-38.
- Doherty, F.G. (2001). A review of the Microtox (R) toxicity test system for assessing the toxicity of sediments and soils. *Water Quality Research Journal of Canada*, 36, 475-518.
- Dubbeldam, M., Burger, E., Kooiman, H. & Brand, L. (2005). *Onderzoek naar de mogelijkheden voor het kweken van de zeeklit Echinocardium cordatum*. Studie uitgevoerd in opdracht van RIKZ Tussenrapport fase 2b. Aquasense-Grontmij, Amsterdam.
- EC (2001). Council regulation (EC) No 2375/2001 of 29 November 2001 amending Commission Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *EN Official Journal of the European Communities*, 6.12.2001, L 321/1-5.
- EPA & US-ACE (1998). *Evaluation of dredged material proposed for discharge in waters of the US – Testing Manual*. US Environmental Protection Agency and US Army Corps of Engineers. EPA/823-B-94/002, Washington, DC.
- EPA (1996). *Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1740 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Marine*. Washington DC.
- EPA (2002). *ECOTOX database US-EPA Version 3.0*. On-line toegankelijk via: http://www.epa.gov/cgi-bin/ecotox_quick_search search. U.S. Environmental Protection Agency. 2002. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Database System. Version 3.0. (www.epa.gov/ecotox/)
- Erdem, C. & Meadows, P.S. (1980). The Influence of Mercury on the Burrowing Behavior of *Corophium volutator*. *Mar. Biol.*, 56, 233-237.
- Farre, M., Arranz, F., Ribo, J. & Barcelo, D. (2004). Interlaboratory study of the bioluminescence inhibition tests for rapid wastewater toxicity assessment. *Talanta*, 62, 549-558.
- Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K. & Machala, M. (2002). Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*, 4, 3-16.
- Guchte, C. van der et al. (2000). *Normen voor het waterbeheer*. Den Haag: Commissie Integraal Waterbeheer.
- Hamers, T, Kamstra, J.H., Sonneveld, E., Murk, A.J., Kester, M.H.A., Andersson, P.L., Legler, J. & Brouwer, A. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of brominated flame retardants. (*Manuscript in preparation*)

- Hamers, T., Schaardenburg, M.D. van, Felzel, E.C., Murk, A.J., & Koeman, J.H. (2000). The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *The Science of the Total Environment*, 262, 159-174.
- Harris, G.J. & Morgan, E. (1984). The effects of ethanol, valinomycin and cycloheximide on the endogenous circa-tidal rhythm of the estuarine amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Mar.Behav.Physiol.*, 10,(3), 219-233.
- Hattum, B. van, Hermens, J. & Verbruggen, E. (2000). *Toepassing van de Hydrocarbon Block Methode bij de interpretatie van toxiciteitsexperimenten met minerale olie*. IVM Report (E-00/03). Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Hattum, B. van, Senhorst, H., Tukker, A., Lamoree, M., Sanderson, T. & Koning, A. (2004). *Evaluation of current emissions of chlorinated microcontaminants from the Dutch chlorine chain*. Report nr. E04/08. Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Hattum, B. van, Senhorst, Tukker, H.A., Lamoree, M., Sanderson, T. & Koning, A. de (2004). *Evaluation of current emissions of chlorinated microcontaminants from the Dutch chlorine chain*. IVM Report. Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Heisse, S., Förstner, U., Westrich, B. & Salomons, W. et al. (2004). *Inventory of historical contaminated sediment in Rhine Basin and its tributaries*. Technical University Hamburg, University of Stuttgart.
- Hermens, J., Busser, F., Leeuwangh, P. & Musch, A. (1985). Quantitative structure activity relationships and mixture toxicity of organic chemicals in *Pphotobacterium phosphoreum*: the Mmicrotox test. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 9, 17-25.
- Hilscherova, K., Machala, M., Kannan, K., Blankenship, A.L. & Giesy, J.P. (2000). Bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 7, 159-171.
- Hoeven, N. van der (2002). *EC50MSPt v1.0*. Ontwikkeld door EcoStat en CaseWare in opdracht van het RIKZ. Het programma is te downloaden via www.zeeslib.nl.
- Houtman, C.J., Cenijn, P.H., Hamers, T., Lamoree, M.H., Legler, J., Murk, A.J. & Brouwer, A. (2004) Toxicological profiling of sediments using in vitro bioassays, with emphasis on endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 32-40.
- Houtman, C.J., Swart, C., Lamoree, M., Legler, J. & Brouwer, A. (2002). DR- and ER-CALUX assays as tools to direct Toxicity Identification and Evaluation of endocrine disrupting chemicals. *Organohalogen Compounds*, 58, 349-352.
- Hurk, P. van den, Chapman, P.M., Roddie, B. & Swartz, R.C. (1992). A Comparison Of North-American And West-European Infaunal Amphipod Species. In A Toxicity Test On North-Sea Sediments. *Marine Ecology-Progress Series*, 9, 237-243.
- Inspectie V&W (2005). *Inspectiekader verspreiden zoute baggerspecie*. Inspectie Verkeer en Waterstaat, Toezichteenheid Waterbeheer. Ministerie Verkeer en Waterstaat, Den Haag (concept).
- Jennings, V.L.K., Rayner-Brandes, M.H. & Bird, D.J. (2001) Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*Vvibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*, 3, 3448-3456.
- Kater, B. (2004). *De populatie dynamische relevantie van respons in een bioassay: De ontwikkeling van een populatie-dynamisch model voor de slijkgarnaal Corophium volutator*. Concept werkdocument. RIKZ, Middelburg.
- Kater, B.J., Hannewijk, A., Postma, J.F. & Dubbeldam, M. (2000). Seasonal changes in acute toxicity of cadmium to amphipod *Corophium volutator*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 3032-3035.

- Kater, B.J., Postma, J.F., Dubbeldam, M. & Prins, J.T.H.J. (2001). Comparison of laboratory and in situ sediment bioassays using *Corophium volutator*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1291-1295.
- Keijzers, C.M. & Hoeven, N. van der (2004). *Kan de reproduceerbaarheid van de Microtox SP worden verbeterd*. Studie uitgevoerd in opdracht van RIKZ. Rapport nr. 2356. Aquasense, Grontmij Groep en EcoStat, Amsterdam.
- Klamer, H.J.C., Leonards, P.E.G., Åkerman, J.E., Hermans, J.H., Smedes, A. van, Vliet, L.A. van, Aarts, J.M.M.J.G., Palmer, R. & Bakker, J.F. (in prep). *Identification, bioavailability and persistence of aryl hydrocarbon receptor agonists in Dutch dredged Material*. (manuscript in preparation).
- Klamer, H.J.C., Jorritsma, J., Vliet, L. van, Smedes, F. & Bakker, J.F. (2004). Dioxine-achtige toxiciteit in baggerslib van het Zeehavenkanaal, Delfzijl. *Toxiciteit Identificatie en Evaluatie (TIE) met DR-CALUX*. RIKZ rapport nr. 2004.013. Rijks Instituut voor Kust en Zee/RIKZ, Haren.
- Klamer, H.J.C., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., Villerius, L.A., Akerman, J.E. & Bakker, J.F. (2005). A chemical and toxicological profile of Dutch North Sea sediments. *Chemosphere*, 58, 1579-1587.
- Kooman, H. (2005). *Chronische sediment toxiciteitstest met de slijkgarnaal Corophium volutator – Concept Standaardvoorschrift CV49*. RIKZ, Middelburg / Den Haag.
- Laane, R.W.P.M., Pijnenburg, J., IJland, E., Groeneveld, G. & Vries, A. (2001). *Selectie probleemstoffen voor de Noordzee. Stand van zaken & analyse*. RIKZ rapportnr. 2000.034. RIKZ, Den Haag.
- Lamoree, M., Swart, K., Senhorst, H. & Hattum, B. van (2004). *Validation of the acidic sample clean-up procedure for the DR-CALUX assay*. Report nr. L04/02. Institute for Environmental Studies, Vrije Universiteit, Amsterdam.
- Leeuwen, C.J. van, Verhaar, H.J.M. & Hermens, J.L.M. (1996). Quality criteria and risk assessment for mixtures of chemicals in the aquatic environment. *Human. Ecol. Risk Assess.*, 6, 419-425.
- Legler, J. (2001). *Development and application of in vitro and in vivo reporter gene assays for the assessment of (xeno-)estrogenic compounds in the aquatic environment*. PhD Dissertation, Wageningen University, The Netherlands, 132 pp.
- Leonards, P.E.G. & Veen, I. van der (2001). *Chemische validatie van analysemethoden in sediment voor de toepassing van de DR-Calux*. RIVO rapport no. C076/01, RIVO, IJmuiden (in Dutch).
- Londesborough, S. (2005). *Proposal for Environmental Water Quality Standards in Finland*. Report nr. FE749. Finnish Environment Institute (SYKE), Helsinki.
- Long, E., Bergmann, H., Gandrass, J., Thain, J. & Reed, J. (2001). Final report audit panel, Netherlands. Geciteerd in *Schipper en Schout* (2004).
- Maas, J.L. & Heuvel-Greve, M. van den (2005). *Opportunities for bio-analysis in WFD chemical monitoring using bioassays*. RIZA /RIKZ report. (draft report).
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M. & Neca, J.V. (2001). Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res*, 497, 49-62.
- McCarty, L.S. & Mackay, D. (1993). Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environ. Sci. & Technol.*, 27, 1719-1728.
- McCarty, L.S., Mackay, D., Smith, A.D., Ozburn, G.W. & Dixon, D.G. (1993). Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration qsars from aquatic bioassays polar narcotic organics. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 25, 253-270.

- Munns, W.R. et al. (2002). Toxicity testing, risk assessment, and options for dredged material management. *Mar. Poll. Bull.*, 44, 294-302.
- Murk, A.J., Legler, J., Denison, M.S., Giesy, J.P., Guchte, C. van de & Brouwer, A. (1996). Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol.*, 33, 149-160.
- Nendza, M. (2002). Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, 48, 865-883.
- Nuyl, O. te (2004). *Evaluatie rapport audits contractlaboratoria*. Rapport nr. RIKZ/OS.2005.803w, RIKZ, Den Haag.
- Overmeire, I. van, Clark, G.C., Brown, D.J., Chu, M.D., Marcus Cooke, W., Denison, M.S., Baeyens, W., Srebrnik, S. & Goeyens, L. (2001). Trace contamination with dioxin-like chemicals: evaluation of bioassay-based TEQ determination for hazard assessment and regulatory responses. *Environmental Science & Policy*, 4, 345-357. 124, 17-31.
- Peene, E., Dubbeldam, M. & Burger, E.M. (2005). *Een ammoniumbestendige test voor Corophium volutator volgens RIKZ /-Specie-01 – alternatieven voor de standaardtestmethode*. Rapport nr. 1996. Aquasense, Amsterdam.
- Peters, C. & Ahlf, W. (2005). Reproduction of the estuarine and marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in laboratory for toxicity testing. *Chemosphere*, 59, 525-536.
- Peters, C. et al. (2002). A marine Bioassay test set to assess marine water and sediment quality - its need, the approach and first results. *Ecotoxicolog*, 11, 379-383.
- Pluim, H.J., Slot, P.C., Olie, K., Slikke, J.W. van der & Kopper, J.G. (1992). Diurnal variations in concentrations of PCDDs and PCDFs in human milk. *Chemosphere*, 25, 307-311.
- Posthuma, L., Suter, G.W., Traas, T.P. (2002). *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*. Boca Raton (USA), Lewis Publishers.
- Postma, J.F. & Keijzers, C.M. (2005). *TIE Fase-1 op baggerspecie uit Noord-Nederland. Studie uitgevoerd in opdracht van RIKZ*. Rapport nr. 2097, Aquasense, Grontmijgroep, Amsterdam (concept rapport).
- Postma, J.F. et al. (2002) Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5, 226-237.
- RIKZ (2004). Vriesdrogen, extractie en opschoning van sedimentmonsters ter bepaling van 2,3,7,8-TCDD Toxische Equivalenten (TCDD-TEQs) met behulp van de DR CALUX bioassay van BDS - Standaardvoorschrift SPECIE-07-E, versie 1. RIKZ, Den Haag. In meest recente editie van *Schipper en Stronkhorst (1999)*.
- RIKZ (2005a). Sediment toxiciteitstest met *Corophium volutator*. RIKZ Standaardvoorschrift SPECIE-01, versie 5. RIKZ, Den Haag. In meest recente editie van *Schipper en Stronkhorst (1999)*.
- RIKZ (2005b). Sediment toxiciteitstest met Microtox Solid Phase. RIKZ Standaardvoorschrift SPECIE-02, versie 5., RIKZ, Den Haag. In meest recente editie van *Schipper en Stronkhorst (1999)*.
- RIKZ (2005c). Bepaling van 2,3,7,8-TCDD toxische equivalenten (TCDD-TEQs) in sedimenten met behulp van de DR CALUX (Chemical Activated LUciferase gene eXpression) bioassay van BioDetection Systems BV (BDS) - Standaardvoorschrift SPECIE-07, versie 4. RIKZ, Den Haag. In meest recente editie van *Schipper en Stronkhorst (1999)*.
- RIKZ (2005d). *Chronische sediment toxiciteitstest met de slijkgarnaal Corophium volutator. Concept Standaardvoorschrift CV49*. Den Haag: RIKZ.

- Ringwood, A.H., DeLorenzo, M.E., Ross, P.E. & Holland, A.F. (1997) Interpretation of Microtox(R) solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1135-1140.
- RWS (1998). *Vierde Nota Waterhuishouding: Regeringsbeslissing*. Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat, Den Haag.
- Sanderson, J.T., Aarts, J.M., Brouwer, A., Froese, K.L., Denison, M.S. & Giesy, J.P. (1996). Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 137, 316-325.
- Schipper C.A. & Stronkhorst J. (1999). *Handboek Toxiciteitstesten voor Zoute baggerspecie*. Rapportnr. RIKZ/99.012 - ISBN 90-369-3493-1. RIKZ, Den Haag.
- Schipper, C.A. & Schout, P. (2003). *De weg naar de implementatie van de Chemie-Toxiciteit-Toets*. Rapportnr. RIKZ/2003.036. RIKZ, Den Haag.
- Schipper, C.A. (1999). *QA/QC bij de uitvoering van bioassays met zoute baggerspecie*. Den Haag: RIKZ.
- Schoeters, G., Goyvaerts, M.P., Ooms, D. & Cleuvenbergen, R. van (2004). The evaluation of dioxin and dioxin-like contaminants in selected food samples obtained from the Belgian market: comparison of TEQ measurements obtained through the CALUX bioassay with congener specific chemical analyses. *Chemosphere*, 54, 1289-1297.
- Spier, J.L., Lahr, J., Postma, J.F., Dubbeldam, M. & Groenewold, S. (2002). *Evaluatie bioassay zeeklit – chronologische evaluatie van onderzoek en monitoring met Echineocardium cordatum*. Rapport nr. 2002.2310. Aquasense, Grontmij, Amsterdam.
- Stronkhorst, J. & Hattum, B. van (2003a). Contaminants of concern in Dutch marine Harbor Sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 306-316.
- Stronkhorst, J., Ariese, F., Hattum, B. van, Postma, J.F., Kluijver, M. de, Besten, P.J. den, Bergman, P.J., Daan, M.J.N., Murk, A.J. & Vethaak, A.D. (2003). Environmental impact and recovery at two dumping sites for dredged material in the North Sea. *Environmental Pollution*, 124, 17-31.
- Stronkhorst, J., Ciarelli, S., Schipper, C.A., Postma, J.F., Dubbeldam, Vangheluwe, V.M., Brils, J.M. & Hoofman, R. (2004). Interlaboratory comparison of five marine bioassays for evaluation the toxicity of dredged material, Aquatic Ecosystem. *Health & Management*, 7(1), 147-159.
- Stronkhorst, J., Hattum, B. van & Bowmer, T. (1999). Bioaccumulation and Toxicity of Tributyltin to a Burrowing Heart Urchin and an Amphipod in Spiked, Silty Marine Sediments. *Environ.Toxicol.Chem.*, 18(10), 2343-2351.
- Stronkhorst, J., Leonards, P. & Murk, A.J. (2002). Using the dioxin receptor-calux in vitro bioassay to screen marine harbor sediments for compounds with a dioxin-like mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2552-2561.
- Stronkhorst, J., Long, E.R. & Verhaar, H. (2004?). Relationships between toxicity in laboratory tests and chemical contamination of Dutch harbour sediment. Submitted to *Env.c Toxicol. Chem.... Chapter 8 in Thesis. J. Stronkhorst (2003)*.
- Stronkhorst, J., Schipper, C., Brils, J., Dubbeldam, M., Postma, J. & Hoeven, N. van de (2003b). Using marine bioassays to classify the toxicity of Dutch harbor sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1535-1547.
- Stronkhorst, J., Schot, M.E., Dubbeldam, M.C. & Ho, K.T. (2003). A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 56-64.

- Terrabase (1998). Software Suite Version 1.502 1997-1998 TerraBase Inc., 3350 Fairview St., Suite 160 Burlington, ON, L7N 3L5 Canada.
- TGD (1996). *Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances - Part-III*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- UNEP (2001). *Standardized Toolkit for Identification and Quantification of Dioxin and Furan Releases*. Draft. UNEP Chemicals Switzerland.
- Verbruggen, E.J.M. (1999). *Predicting hydrophobicity, bioconcentration and baseline toxicity of complex organic mixtures*. Thesis. University of Utrecht.
- VROM (2004). Regeling milieukwaliteitseisen gevaarlijke stoffen oppervlaktewateren. *Staatscourant 22 december 2004*, nr. 247, p. 34.
- Wagemaker, F., Knijff, L., Duynhoven, N. van, Legierse, K. & Pijnenburg, J. (2003). *Probleem-verkenning prioritaire stoffen (fact sheets)*. Rapport nr. 2003-222X. RIZA / RIKZ, Lelystad / Den Haag.
- Warne, M.J. (2003). A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendations for, their management. In Langly, A., Gilbey, M. & Kennedy, B. (2003), *Proceedings of the 5th national workshop on the assessment of site contamination*. National Environmental protection Council Service Corporation, Adelaide (Australia), pp. 253-276.
- Wezel, A.P. van (1999). *Overview of international programmes on the assessment of existing chemicals*. RIVM-report-601503.015. RIVM, Bilthoven.
- Wezel, A.P. van, Vries, D.A.M. de, Kostense, S., Sijm, D.T.H.M. & Opperhuizen, A. (1995). Intraspecies variation in lethal body burdens of narcotic compounds. *Aquatic Toxicology*, 33, 325-342.
- Zwart, D. de & Sterkenburg, A. (2002). Toxicity-based assessment of water quality. In Posthuma et al. (Eds.), *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*. (pp. 383-402). Boca Raton (USA): Lewis Publishers.
- Zwart, D. de (2002). Observed regularities in species sensitivity distributions for aquatic species. In Posthuma et al. (Eds.), *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*. (pp 133-154). Boca Raton (USA): Lewis Publishers.
- Zwart, D. de (2005). *Impact of toxicity on species composition of aquatic communities: concordance of predictions and field observations*. Thesis University of Amsterdam. (Netherlands).

Appendix I. Publicaties testorganismen in ISI-WoK

In ISI-WoK (Web of Knowledge) opgenomen internationale publicaties onder:
soortnaam + toxicity.

Echinocardium: 5 of which 3 relevant

Corophium: 47

Vibrio: 34

Echinocardium cordatum

- Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L. & Scholten, M.C.T. (2002). Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2242-2251.
- Stronkhorst, J., Hattum, B. van & Bowmer, T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of tributyltin to a burrowing heart urchin and an amphipod in spiked, silty marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2343-2351.
- Stronkhorst, J., Schipper, C., Brils, J., Dubbeldam, M., Postma, J. & Hoeven, N. van de (2003). Using marine bioassays to classify the toxicity of Dutch harbor sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1535-1547.
- Takada, N., Watanabe, M., Suenaga, K., Yamada, K., Kita, M. & Uemura, D. (2001). Isolation and structures of hedathiosulfonic acids A and B, novel thiosulfonic acids from the deep-sea urchin *Echinocardium cordatum*. *Tetrahedron Letters*, 42, 6557-6560.

Corophium volutator

- Andersen, H.V., Kjolholt, J., Poll, C., Dahl, S.O., Stuer-Lauridsen, F., Pedersen, F. & Bjornestad, E. (1998). Environmental risk assessment of surface water and sediments in Copenhagen harbour. *Water Science and Technology*, 37, 263-272.
- Bat, L. & Raffaelli, D. (1998). Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226, 217-239.
- Bat, L., Raffaelli, D. & Marr, I.L. (1998). The accumulation of copper, zinc and cadmium by the amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 223, 167-184.
- Batley, G.E., Burton, G.A., Chapman, P.M. & Forbes, V.E. (2002). Uncertainties in sediment quality weight-of-evidence (WOE) assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8, 1517-1547.
- Briggs, A.D., Greenwood, N. & Grant, A. (2003). Can turbidity caused by *Corophium volutator* (Pallas) activity be used to assess sediment toxicity rapidly? *Marine Environmental Research*, 55, 181-192.
- Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L. & Scholten, M.C.T. (2002). Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 2242-2251.

- Brown, R.J., Conradi, M. & Depledge, M.H. (1999). Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). *The Science of The Total Environment*, 233, 77-88.
- Bryant, V., Mclusky, D.S., Roddie, K. & Newbery, D.M. (1984). Effect of temperature and salinity on the toxicity of chromium to 3 estuarine invertebrates (*Corophium-Volutator*, *Macoma-Balthica*, *Nereis-Diversicolor*). *Marine Ecology-Progress Series*, 20, 137-149.
- Bryant, V., Newbery, D.M., Mclusky, D.S. & Campbell, R. (1985). Effect Of Temperature And Salinity On The Toxicity Of Arsenic To 3 Estuarine Invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*, *Tubifex costatus*). *Marine Ecology-Progress Series*, 24, 129-137.
- Bryant, V., Newbery, D.M., Mclusky, D.S. & Campbell, R. (1985). Effect of temperature and salinity on the toxicity of nickel and zinc to 2 estuarine invertebrates (*Corophium volutator*, *Macoma balthica*). *Marine Ecology-Progress Series*, 24, 139-153.
- Chapman, P.M. & Wang, F.Y. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 3-22.
- Ciarelli, S., Straalen, N.M. van, Klap, V.A. & Wezel, A.P. van (1999). Effects of sediment bioturbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 318-328.
- Ciarelli, S., Vonck, W.A.P.M. & Straalen, N.M. van (1997). Reproducibility of spiked-sediment bioassays using the marine benthic amphipod, *Corophium volutator*. *Marine Environmental Research*, 43, 329-343.
- Ciarelli, S., Vonck, W.A.P.M., Straalen, N.M. & Stronkhorst, J. (1998). Ecotoxicity assessment of contaminated dredged material with the marine amphipod *Corophium volutator*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 350-356.
- Collier, L.M. & Pinn, E.H. (1998). An assessment of the acute impact of the sea lice treatment ivermectin on a benthic community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 230, 131-147.
- Conlan, K.E. (1994). Amphipod Crustaceans And Environmental Disturbance - A Review. *Journal of Natural History*, 28, 519-554.
- Conradi, M. & Depledge, M.H. (1998). Population responses of the marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) to copper. *Aquatic Toxicology*, 44, 31-45.
- Conradi, M. & Depledge, M.H. (1999). Effects of zinc on the life-cycle, growth and reproduction of the marine amphipod *Corophium volutator*. *Marine Ecology-Progress Series*, 176, 131-138.
- Correia, A.D., Costa, M.H., Ryan, K.P. & Nott, J.A. (2002). Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea): I. Copper-containing granules within the midgut gland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82, 827-834.
- Costa, F.O., Neuparth, T., Correia, A.D. & Costa, M.H. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. *Marine Environmental Research*, 60, 93-110.
- Daan, R. & Mulder, M. (1996). On the short-term and long-term impact of drilling activities in the Dutch sector of the North Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 53, 1036-1044.
- Davies, I.M., Gillibrand, P.A., McHenry, J.G. & Rae, G.H. (1998). Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture*, 163, 29-46.
- Edgar, G.J., Macleod, C.K., Mawbey, R.B. & Shields, D. Broad-scale effects of marine salmonid aquaculture on macrobenthos and the sediment environment in southeastern Tasmania. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology In Press, Corrected Proof*.

- Engle, V.D., Summers, J.K. & Gaston, G.R. (1994). A Benthic Index Of Environmental-Condition Of Gulf-Of-Mexico Estuaries. *Estuaries*, 17, 372-384.
- Ford, A.T., Fernandes, T.F., Rider, S.A., Read, P.A., Robinson, C.D. & Davies, I.M. (2003). Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea. *Marine Ecology-Progress Series*, 265, 303-309.
- Grant, A. & Briggs, A.D. (2002). Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts? *Marine Environmental Research*, 53, 95-116.
- Hall, L.W. & Anderson, R.D. (1995). The Influence Of Salinity On The Toxicity Of Various Classes Of Chemicals To Aquatic Biota. *Critical Reviews in Toxicology*, 25, 281-346.
- Hauton, C., Atkinson, R.J.A. & Moore, P.G. (2003). The impact of hydraulic blade dredging on a benthic megafaunal community in the Clyde Sea area, Scotland. *Journal of Sea Research*, 50, 45-56.
- Hurk, P. van den, Chapman, P.M., Roddie & Swartz, R.C. (1992). A Comparison Of North-American And West-European Infaunal Amphipod Species In A Toxicity Test On North-Sea Sediments. *Marine Ecology-Progress Series*, 91, 237-243.
- Hyne, R.V., Gale, S.A. & King, C.K. (2005). Laboratory culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Melita plumulosa* (Zeidler). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2065-2073.
- Hyne, R.V., Hogan, A.C., Pablo, F. & Roach, A.C. (2002). Toxicity of Selenomethionine- and Seleno-Contaminated Sediment to the Amphipod *Corophium* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 30-37.
- Kater, B.J., Hannewijk, A., Postma, J.F. & Dubbeldam, M. (2000). Seasonal changes in acute toxicity of cadmium to amphipod *Corophium volutator*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 3032-3035.
- Kater, B.J., Postma, J.F., Dubbeldam, M. & Prins, J.T.H.J. (2001). Comparison of laboratory and in situ sediment bioassays using *Corophium volutator*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1291-1295.
- Kirkpatrick, A.J., Gerhardt, A., Dick, J.T.A., McKenna, M. & Berges, J.A. Use of the multispecies freshwater biomonitor to assess behavioral changes of *Corophium volutator* (Pallas, 1766) (Crustacea, Amphipoda) in response to toxicant exposure in sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety In Press, Corrected Proof*.
- Marsden, I.D. & Wong, C.H.T. (2001). Effects of sediment copper on a tube-dwelling estuarine amphipod, *Paracorophium excavatum*. *Marine and Freshwater Research*, 52, 1007-1014.
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M.F., Law, R.J., McMinn, W.R., Sheahan, D.A., Thain, J.E. & Whale, G.F. (1998). An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Marine Environmental Research*, 45, 1-15.
- McPherson, C.A. & Chapman, P.M. (2000). Copper effects on potential sediment test organisms: The importance of appropriate sensitivity. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 656-665.
- Neuparth, T., Costa, F.O. & Costa, M.H. (2002). Effects of temperature and salinity on life history of the marine amphipod *Gammarus locusta*. Implications for ecotoxicological testing. *Ecotoxicology*, 11, 61-73.
- Noack, U., Becker, S. & Kraetzig, G. (2003). Marine biotest: Comparative investigations on acute toxicity of ammonium chloride to *Corophium volutator*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 608-612.
- Onorati, F., Bigongiari, N., Pellegrini, D. & Giuliani, S. (1999). The suitability of *Corophium orientale* (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2, 465-473.

- Pedersen, F., Bjornestad, E., Andersen, H.V., Kjolholt, J. & Poll, C. (1998). Characterization of sediments from Copenhagen harbour by use of biotests. *Water Science and Technology*, 37, 233-240.
- Pellegrini, D., Ausili, A., Onorati, F., Ciuffa, G., Gabellini, M., Bigongiari, N. & Ranieri, S. De (1999). Characterisation of harbour and coastal sediments: specific destinations of dredged material. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2, 455-464.
- Peters, C. & Ahlf, W. (2005). Reproduction of the estuarine and marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in laboratory for toxicity testing. *Chemosphere*, 59, 525-536.
- Peters, C., Becker, S., Noack, U., Pfitzner, S., Bulow, W., Barz, K., Ahlf, W. & Berghahn, R. (2002). A marine Bioassay test set to assess marine water and sediment quality - its need, the approach and first results. *Ecotoxicology*, 11, 379-383.
- Reish, D.J. (1993). Effects Of Metals And Organic-Compounds On Survival And Bioaccumulation In 2 Species Of Marine Gammaridean Amphipod, Together With A Summary Of Toxicological Research On This Group. *Journal of Natural History*, 27, 781-794.
- Riba, I., DelValls, T.A., Forja, J.M. & Gomez-Parra, A. (2003). Comparative toxicity of contaminated sediment from a mining spill using two amphipods species: *Corophium volutator* (Pallas, 1776) and *Ampelisca brevicornis* (A. costa, 1853). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 1061-1068.
- Roddie, B., Kedwards, T., Ashbycrane, R. & Crane, M. (1994). The Toxicity To *Corophium Volutator* (Pallas) Of Beach Sand Contaminated By A Spillage Of Crude-Oil. *Chemosphere*, 29, 719-727.
- Scarlett, A., Galloway, T.S., Canty, M., Smith, E.L., Nilsson, J. & Rowland, S.J. (2005). Comparative toxicity of two oil dispersants, superdispersant-25 and corexit 9527, to a range of coastal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1219-1227.
- Schlekat, C.E., Decho, A.W. & Chandler, G.T. (2000). Bioavailability of particle-associated silver, cadmium, and zinc to the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* through dietary ingestion. *Limnology and Oceanography*, 45, 11-21.
- Stronkhorst, J., Hattum, B. van & Bowmer, T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of tributyltin to a burrowing heart urchin and an amphipod in spiked, silty marine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2343-2351.
- Stronkhorst, J., Schipper, C., Brils, J., Dubbeldam, M., Postma, J. & Hoeven, N. van de (2003). Using marine bioassays to classify the toxicity of Dutch harbor sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 1535-1547.
- Stronkhorst, J., Schot, M.E., Dubbeldam, M.C. & Ho, K.T. (2003). A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 56-64.
- Tay, K.L., Doe, K.G., Wade, S.J., Vaughan, D.A., Berrigan, R.E. & Moore, M.J. (1992). Sediment bioassessment in Halifax harbor. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1567-1581.
- Wallace, W.G. & Estephan, A. (2004). Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquatic Toxicology*, 69, 289-297.
- Weideborg, M., Vik, E.A., Ofjord, G.D. & Kjonno, O. (1997). Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of off-shore chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 384-389.

Vibrio fischeri

- Andersen, S., Rasmussen, G., Snilsberg, P., Amundsen, C.E. & Westby, T. (1996). Assessing toxicity and mobilisation of impregnation salts at a contaminated site. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 354, 676-680.
- Berden Zrimec, M., Zrimec, A., Slanc, P., Kac, J. & Kreft, S. (2004). Screening for antibacterial activity in 72 species of wood-colonizing fungi by the *Vibrio fischeri* bioluminescence method. *Journal of Basic Microbiology*, 44, 407-412.
- Blaha, L., Klanova, J., Klan, P., Janosek, J., Skarek, M. & Ruzicka, R. (2004). Toxicity increases in ice containing monochlorophenols upon photolysis: Environmental consequences. *Environmental Science & Technology*, 38, 2873-2878.
- Castro, E.A., Toropov, A.A., Nesterova, A.I. & Nazarov, A.U. (2003). QSAR study of the toxic action of aliphatic compounds to the bacteria *Vibrio fischeri* based on correlation weighting of local graph invariants. *Journal of Molecular Structure-Theochem*, 639, 129-135.
- Cronin, M.T.D. & Schultz, T.W. (1997). Validation of *Vibrio fischeri* acute toxicity data: mechanism of action-based QSARs for non-polar narcotics and polar narcotic phenols. *Science of the Total Environment*, 204, 75-88.
- Dearden, J.C., Cronin, M.T.D. & Dobbs, A.J. (1995). Quantitative Structure-Activity-Relationships As A Tool To Assess The Comparative Toxicity Of Organic-Chemicals. *Chemosphere*, 31, 2521-2528.
- Dimou, A.D., Sakkas, V.A. & Albanis, T.A. (2005). Metolachlor photodegradation study in aqueous media under natural and simulated solar irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 694-701.
- Farre, M. & Barcelo, D. (2001). Characterization of wastewater toxicity by means of a whole-cell bacterial biosensor, using *Pseudomonas putida*, in conjunction with chemical analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371, 467-473.
- Fuller, C., Bonner, J., Page, C., Ernest, A., McDonald, T. & McDonald, S. (2004). Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 2941-2949.
- Galic, M., Sipos, L. & Raspor, B. (1987). Toxicity Of Cadmium And Nitrilotriacetic Acid In Sea-Water To The Photobacteria *Vibrio-Fischeri*. *Science of the Total Environment*, 60, 173-184.
- Galichet, F., Mailhot, G., Bonnemoy, F., Bohatier, J. & Bolte, M. (2002). Iron(III) photo-induced degradation of isoproturon: correlation between degradation and toxicity. *Pest Management Science*, 58, 707-712.
- Gotvajn, A.Z. & Zagorc-Koncan, J. (2003). Hazard identification of pharmaceutical wastewaters using biodegradability studies. *Water Science and Technology*, 47, 197-204.
- Gueguen, C., Gilbin, R., Pardos, M. & Dominik, J. (2004). Water toxicity and metal contamination assessment of a polluted river: the Upper Vistula River (Poland). *Applied Geochemistry*, 19, 153-162.
- Guerra, R. (2001). Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*, 44, 1737-1747.
- Hsieh, C.Y., Tsai, M.H., Ryan, D.K. & Pancorbo, O.C. (2004). Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox (R) chronic toxicity test. *Science of the Total Environment*, 320, 37-50.
- Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G. & Ustun, B. (1999). Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 365-372.

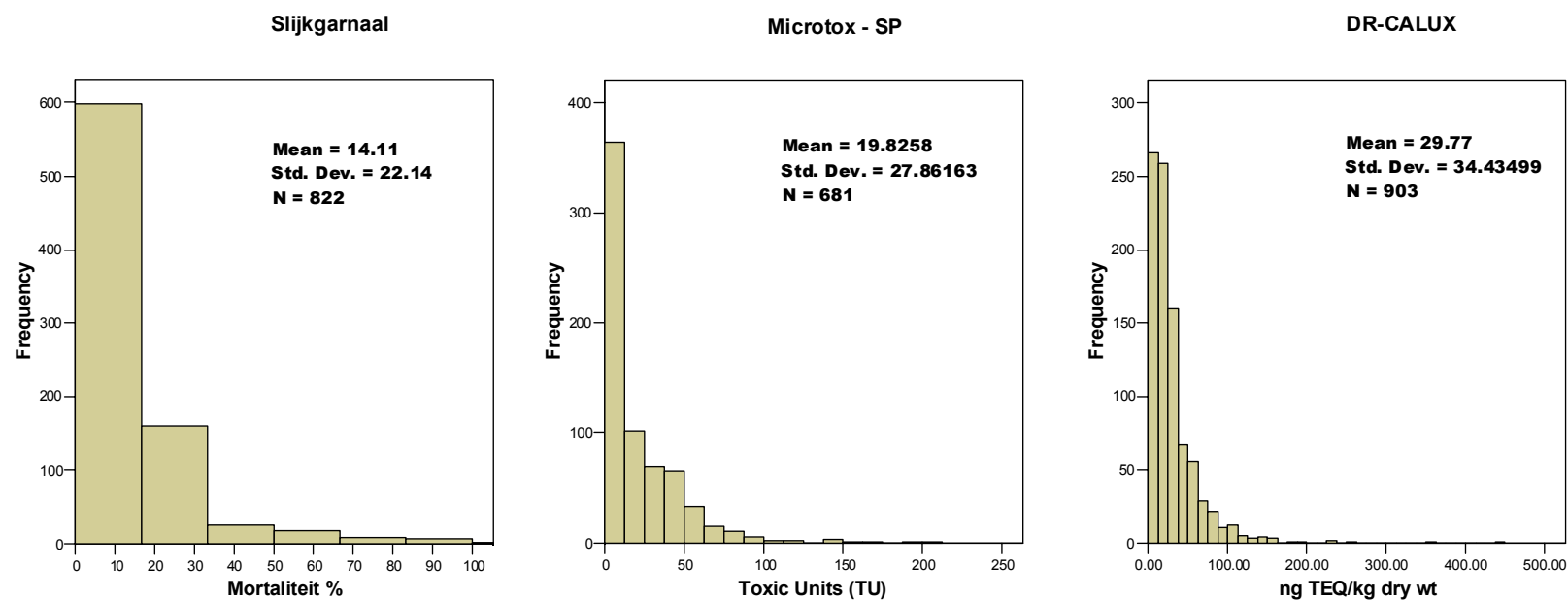
- Jameel, R.H. & Helz, G.R. (1999). Organic chloramines in disinfected wastewaters: Rates of reduction by sulfite and toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1899-1904.
- Kahru, A., Pollumaa, L., Reiman, R., Ratsep, A., Liiders, M. & Maloveryan, A. (2000). The toxicity and biodegradability of eight main phenolic compounds characteristic to the oil-shale industry wastewaters: A test battery approach. *Environmental Toxicology*, 15, 431-442.
- Kim, B.C., Park, K.S., Kim, S.D. & Gu, M.B. (2003). Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay. *Biosensors & Bioelectronics* 18, 821-826.
- Kunz, A., Mansilla, H. & Duran, N. (2002). A degradation and toxicity study of three textile reactive dyes by ozone. *Environmental Technology*, 23, 911-918.
- Lampinen, J., Virta, M. & Karp, M. (1995). Comparison Of Gram-Positive And Gram-Negative Bacterial Strains Cloned With Different Types Of Luciferase Genes In Bioluminescence Cytotoxicity Tests (Vol 10, Pg 41, 1995). *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 157-166.
- Lampinen, J., Virta, M. & Karp, M. (1995). Comparison Of Gram-Positive And Gram-Negative Bacterial Strains Cloned With Different Types Of Luciferase Genes In Bioluminescence Cytotoxicity Tests. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10, 41-48.
- Loschau, M. & Kratke, R. (2005). Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution*, 138, 260-267.
- Malone, J.M., StJohn, T.W., Barlaz, M.A. & Borden, R.H. (1997). Potential toxicity and aerobic biodegradability of sodium silicate chemical grout leachate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 442-446.
- Neamtu, M., Yediler, A., Siminiceanu, I., Macoveanu, M. & Kettrup, A. (2004). Decolorization of disperse red 354 azo dye in water by several oxidation processes - a comparative study. *Dyes and Pigments*, 60, 61-68.
- Okay, O.S., Tolun, L., Tufekci, V., Karacik, B., Kungolos, A., Samaras, P., Papadimitriou, C., Petala, M. & Tsiridis, V. (2005). Comparison of several toxicity tests applied to complex wastewaters and mussel biomarkers in receiving waters. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40, 1525-1541.
- Pimenta, A.S., Bayona, J.M., Garcia, M.T. & Solanas, A.M. (2000). Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of liquid products from pyrolysis of Eucalyptus grandis wood. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 169-175.
- Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira, N. & Freire, D.M.G. (2002). Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, 159-166.
- Schultz, T.W. & Cronin, M.T.D. (1997). Quantitative structure - Activity relationships for weak acid respiratory uncouplers to *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 357-360.
- Steger-Hartmann, T., Lange, R. & Schweinfurth, H. (1999). Environmental risk assessment for the widely used iodinated X-ray contrast agent iopromide (Ultravist). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42, 274-281.
- Wang, Q., Gan, J., Papiernik, S.K. & Yates, S.R. (2000). Transformation and detoxification of halogenated fumigants by ammonium thiosulfate. *Environmental Science & Technology*, 34, 3717-3721.
- Wang, Q.Q., Gan, J.Y., Papiernik, S.K. & Yates, S.R. (2001). Isomeric effects on thiosulfate transformation and detoxification of 1,3-dichloropropene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 960-964.

- Warne, M.A., Boyd, E.M., Meharg, A.A., Osborn, D., Killham, K., Lindon, J.C. & Nicholson, J.K. (1999). Quantitative structure-toxicity relationships for chlorophenols to bioluminescent lux-marked bacteria using atom-based semi-empirical molecular-orbital descriptors. *Sar and Qsar in Environmental Research*, 10, 473-495.
- Yu, R., Coffman, J.P., VanFleetStalder, V. & Chasteen, T.G. (1997). Toxicity of oxyanions of selenium and of a proposed bioremediation intermediate, dimethyl selenone. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 140-145.

Microtox-SP

- Acheson, C.M., Zhou, Q, Shan, Y.G., Sayles, G.D. & Kupferle, M.J. (2004). Comparing the solid phase and saline extract Microtox (R) assays for two polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 245-251.
- Cheung, Y.H. et al. (1997). Assessment of sediment toxicity using different trophic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 260-267.
- Day, K.E., Dutka, B.J., Kwan, K.K., Batista, N., Reynoldson, T.B. & Metcalfesmith, J.L. (1995). Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and in-situ benthic community structure. *Journal of Great Lakes Research*, 21, 192-206.
- Doherty, F.G. (2001). A review of the Microtox (R) toxicity test system for assessing the toxicity of sediments and soils. *Water Quality Research Journal of Canada*, 36, 475-518.
- Ingersoll, C.G., et al. (2002). Toxicity assessment of Sediments from the Grand Calumet River and Indiana Harbor Canal in northwestern Indiana, USA. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43, 156-167.
- Kwan, K.K. & Dutka, B.J. (1995) Comparative-assessment of 2 solid-phase toxicity bioassays - the direct sediment toxicity testing procedure (dsttp) and the microtox(r) solid-phase test (spt). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 338-346.
- Ringwood, A.H., DeLorenzo, M.E., Ross, P.E. & Holland, A.F. (1997) Interpretation of Microtox(R) solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1135-1140.

Appendix II. Frequentieverdeling van de respons in de verschillende biotesten over alle havenvakken (periode 1999-2004)



Figuur 3.2 Frequentieverdeling van respons van de verschillende biotesten: Slijkgarnaal (Specie-01 Protocol), Microtox-SP (Specie-02 Protocol) en DR-CALUX (Specie-07 Protocol). Periode: 1999-2004.

Appendix III. Correlatie-analyse (Spearman's Rho - non-parametrisch)

			Correlations																											
			AS	CD	CR	CJ	HCB	HG	KGV0002	KGV0016	KGV0063	N	OLE_GC	ORG_C	ORG_STOF	PAK_10	PB	PCB_7	S_DDT	SPECIE01	SPECIE02	SPECIE03	SPECIE07	T	ZN					
Spearman's rho	AS	Correlation Coefficient	1.000	.607**	.859**	.721**	.230**	.740**	.757**	.798**	.748**	.809**	.616**	.560**	.505**	.516**	.818**	.317**	.062	.104**	.396**	.419**	.435**	1	.398**	.761**				
		Sig. (2-tailed)																												
		N	1085	1079	1085	1085	1058	1079	1075	1075	1010	1062	1085	1054	622	875	1020	1085	991	426	768	624	266	866	906	1085				
		Correlation Coefficient	.607**	1.000	.757**	.810**	.045	.822**	.429*	.475**	.461**	.704**	.748**	.360**	.512**	.709**	.803**	.128*	.460**	.169*	.028	.009	.603**	.147**	.845**					
CD	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	1079	1079	1079	1079	1057	1079	1069	1010	1062	1079	1048	622	869	1020	1079	991	426	768	624	266	860	900	1079					
		Correlation Coefficient	.757**	1.000	.832**	.719**	.000	.849**	.756**	.703**	.926**	.719**	.519**	.595**	.638**	.688**	.241**	.331**	.106**	.270**	.397**	.578**	.288**	.873**						
		Sig. (2-tailed)																												
CR	AS	N	1085	1079	1085	1085	1058	1079	1075	1010	1062	1085	1054	622	875	1020	1085	991	426	768	624	266	866	906	1085					
		Correlation Coefficient	.721**	1.000	.832**	.719**	.078*	.848**	.545**	.614**	.567**	.849**	.812**	.488**	.500**	.820**	.927**	.196**	.391**	.086**	.223**	.343**	.627**	.294**	.951**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	1085	1079	1085	1085	1058	1079	1075	1010	1062	1085	1054	622	875	1020	1085	991	426	768	624	266	866	906	1085					
HCB	AS	Correlation Coefficient	.230**	.045	.150**	.078*	1.000	.081**	.267**	.286**	.147**	.089**	.029	.304**	.167**	.083**	.105**	.729**	.865**	.093*	.318**	.107	-.178**	.767**	.069*					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	1058	1079	1058	1058	1058	1057	1048	1010	1040	1058	1027	600	848	998	1058	969	404	.753	.622	.266	839	881	1058					
		Correlation Coefficient	.740**	.822**	.849**	.848**	.081**	1.000	.599**	.630**	.609**	.802**	.799**	.492**	.499**	.741**	.879**	.219**	.361**	.099**	.229**	.335**	.656**	.230**	.901**					
HG	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	1079	1079	1079	1079	1057	1079	1069	1010	1062	1079	1048	622	869	1020	1079	991	426	768	624	266	860	900	1079					
		Correlation Coefficient	.757**	.429**	.698**	.545**	.000	.849**	.599**	1.000	.966**	.703**	.719**	.473**	.674**	.353**	.631**	.302**	.167**	.106**	.270**	.397**	.578**	.288**	.873**					
		Sig. (2-tailed)																												
KGV0002	AS	N	1075	1069	1075	1075	1048	1069	1075	1001	1053	1075	1044	621	865	1010	1075	981	417	760	624	266	857	897	1075					
		Correlation Coefficient	.798**	.475**	.756**	.614**	.286**	.630**	.966**	1.000	.886**	.761**	.530**	.707**	.568**	.413**	.692**	.338**	.093*	.073	.466**	.535**	.442**	.450**	.624**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	1010	970	894	1010	979	828	964	979	922	799	864	799	599	849	849	1010					
KGV0063	AS	Correlation Coefficient	.748**	.461**	.703**	.587**	.147**	.609**	.850**	.886**	1.000	.703**	.488**	.533**	.478**	.388**	.649**	.189**	-.163**	.124**	.341**	.595**	.464**	.287**	.504**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	1062	1062	1062	1062	1040	1062	1053	994	1062	1062	1031	610	852	1003	1062	978	426	768	624	266	850	896	1062					
		Correlation Coefficient	.809**	.704**	.926**	.849**	.089**	.862**	.700**	.761**	.703**	1.000	.703**	.582**	.656**	.652**	.876**	.146**	.338**	.038	.277**	.485**	.591**	.254**	.866**					
N	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	1085	1079	1085	1085	1058	1079	1075	1010	1062	1085	1054	622	875	1020	1085	991	426	768	624	266	866	906	1085					
		Correlation Coefficient	.616**	.748**	.719**	.719**	.029	.799**	.473**	.530**	.488**	.703**	.702**	1.000	.414**	.509**	.766**	.766**	.189**	.336	.169**	.207**	.626**	.253**	.800**					
		Sig. (2-tailed)																												
OLE_GC	AS	N	1054	1048	1054	1054	1027	1048	1044	979	1031	1054	1054	613	844	1020	1054	960	417	744	624	266	836	897	1054					
		Correlation Coefficient	.560**	.360**	.519**	.488**	.304**	.492**	.674**	.707**	.533**	.582**	.414**	1.000	.631**	.387**	.562**	.231**	.051	.083	.482**	.491**	.200**	.384**	.528**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	522	622	622	622	600	622	621	561	610	613	622	613	592	547	622	613	592	547	430	507	418	580	622					
ORG_STOF	AS	Correlation Coefficient	.505**	.512**	.595**	.600**	.167**	.499**	.488**	.568**	.478**	.656**	.509**	.631**	1.000	.484**	.620**	.194**	-.265**	.028	.193**	.475**	.444**	.330**	.572**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	875	869	875	875	848	869	865	808	852	875	844	430	875	844	430	875	786	.429	82	669	700	875						
		Correlation Coefficient	.516**	.709**	.636**	.820**	.083**	.741**	.353**	.413**	.388**	.652**	.766**	.387**	.876**	.812	.485	.612	.223**	.329**	.065	.119**	.150**	.547**	.219**	.801**				
PAK_10	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020	1020					
		Correlation Coefficient	.818**	.803**	.883**	.927**	.105*	.879**	.631**	.692**	.649**	.779**	.766**	.562**	.820**	.762**	1.000	.234**	.374**	.120**	.285**	.404**	.607**	.284**	.953**					
		Sig. (2-tailed)																												
PB	AS	N	1085	1079	1085	1085	1058	1079	1075	1010	1062	1085	1054	622	875	1020	1085	991	426	768	624	266	866	906	1085					
		Correlation Coefficient	.317**	.126**	.241**	.196**	.729**	.219**	.302**	.338**	.189**	.146**	.189**	.231**	.194**	.223**	.234**	1.000	.710**	.098**	.291**	.166**	-.029	.787**	.194**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991	991					
S_DDT	AS	Correlation Coefficient	-.062	-.460**	-.331**	-.391**	.865**	-.361**	.167**	.094	-.163**	-.338**	-.353**	.051	-.265**	-.399**	-.374**	.710**	1.000	.058	.308**	.084	-.513**	.784**	-.416**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	426	426	426	426	426	426	426	426	426	426	417	347	227	417	426	426	426	312	307	187	382	377	426					
		Correlation Coefficient	.104**	.166**	.106**	.086**	.093*	.099**	.114**	.087**	.124**	.028	.036	.083	.028	.065	.120**	.098**	.058	1.000	.060	.183**	.001	.057	.101**					
SPECIE01	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	004	000	003	017	011	.006	.002	.017	.001	.291	.330	.061	.494	.080	.001	.009	.306	-.001	.145	.005	.974	.128	.005					
		Correlation Coefficient	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769	.769					
		N	396**	.028	.270**	.223**	.311**	.225**	.496**	.466**	.291**	.277**	.169**	.285**	.193**	.119**	.308**	.060	1.000	.478**	.094**	.479**	.202**	.000	.000					
SPECIE02	AS	Sig. (2-tailed)																												
		N	624	624	624	624	602	624	624	569	624	624	624	418	429	613	624	591	307	591	681	245	650	604	624					
		Correlation Coefficient	.419**	.009	.397**	.343**	.107	.335**	.535**	.535**	.595**	.485**	.207**	.491**	.475**	.150**	.404**	.166**	-.084	.183**	.478**	1.000	.359**	.213**	.359**					
		Sig. (2-tailed)																												
SPECIE03	AS	N	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266	266					
		Correlation Coefficient	.435**	.603**	.578**	.627**	-.178**	.656**	.343**	.442**	.561**	.464**	.547**	.626**	.200**	.444**	.607**	-.029	.513**	.094**	.359**	1.000	.472**	.530**	.630**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	866	860	866	866	839	860	857	799	850	866	836	580	669	807	866	797	382	783	650	264	903	794	866					
T38T	AS	Correlation Coefficient	.398**	.147**	.288**	.294**	.767**	.230**	.460**	.450**	.287**	.254**	.253**	.330**	.219**	.384**	.787**	.784**	.057	.479**	.213**	-.032	.294**	.000	.235**					
		Sig. (2-tailed)																												
		N	906	900	906	906	881	900	897	849	896	906	897	965	700	875	906	906	906	.128	.000	.001	.362	.000	.000					
		Correlation Coefficient	.845**	.871**	.871**	.871**	.869**	.871**	.871**	.871**	.869**	.869																		

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).